

**Modulation profibrotischer Grenzflächenreaktionen durch
Angiogenese-Therapie zur Stimulation der Biointegration
azellulärer, dermaler Allotransplantat**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich – Schiller – Universität Jena

von Cornelia Katharina Müller

geboren am 29.01.1985 in Suhl

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau, Jena**
- 2. Prof. Dr. Utz Settmacher, Jena**
- 3. Prof. Dr. Dr. Henning Schliephake, Goettingen**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.05.2009

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADM	A zelluläre D ermale M atrix
AB-HRP	A vidin- B iotin- H orse- R adisch- P eroxidase
bp	B asenpaare
BSA	B ovine S erum A lbumine
cm	Zentimeter
COL	C ollagen
DAB	3,3- D iaminobenzidin
D-MEM	D ulbecco`s M odified E agle`s M edium
ECM	E xtra C ellular M atrix
EPC	E ndothelial P rogenitor C ell
FACS	F luorescence A ctivated C ell S orting
FCS	F etal C alf S erum
GFP	G reen F luorescent P rotein
Gy	G ray
HE	H ämalaun- E osin
HPF	H igh P ower F ield; 400× Originalvergrößerung
Ig	I mmunglobulin
i.p.	intra p eritoneal
KG	K örpergewicht
LB	L ysogeny B roth
LM	L icht- M ikroskop
OP	O peration
PAI-I	P lasminogen A ctivator I nhibitor I
PBS	P hosphate B uffered S aline
p.op.	post o perationem
prä.op.	p rä o perationem
REM	R aster- E lektronen- M ikroskopie
RIPA	R adio- I mmuno- P recipitation- A ssay
RT	R aum- T emperatur
SA	S tandard- A bweichung
s.c.	subcutan

SOC

TBS-(T)

TGF-beta

TGF-beta-R

Tx

U/min

VEGF

Super Optimal Broth + Glucose

Tris-~~B~~uffers-~~S~~aline-(~~T~~ween)

Transforming Growth Factor beta

Transforming Growth Factor beta Receptor

Transplantat

Umdrehungen/min

Vascular Endothelial Growth Factor

II INHALTSVERZEICHNIS

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
II INHALTSVERZEICHNIS	V
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	VIII
2 EINLEITUNG.....	1
2.1 Azelluläre, dermale Allo-Tx.....	1
2.1.1 Klinische Studien.....	1
2.1.2 Prä-klinische Studien.....	3
2.2 TGF-beta1 und profibrotische Gewebereorganisation.....	3
2.3 Neovaskularisation.....	5
2.3.1 Angiogenese.....	5
2.3.2 Vaskulogenese.....	6
2.4 Therapeutische Angiogenese.....	7
2.4.1 Gentherapie.....	7
2.4.2 Protein-Delivery	8
2.4.3 Zelltransplantation.....	8
3 ZIELE DER ARBEIT	9
4 MATERIAL UND METHODE.....	11
4.1 Zusammenfassung.....	11
4.2 Versuchstiere.....	12
4.3 Biometrie.....	12
4.4 Azelluläre, dermale Allo-Tx.....	13
4.4.1 Herstellung.....	13
4.4.2 Rasterelektronenmikroskopie.....	13
4.5 Zungenbiopsie.....	14
4.5.1 Anästhesie.....	14
4.5.2 OP.....	14
4.5.3 Postoperative Nachsorge.....	15
4.6 Aufbereitung der Biopsie.....	15
4.6.1 Separation des Epithels vom Bindegewebe.....	15
4.6.2 Isolation und Primärkultur mukosaler Fibroblasten.....	16
4.6.3 Passage.....	17
4.6.4 Zellzahlbestimmung.....	17
4.7 Gentechnologische Arbeiten	18
4.7.1 Plasmide	18

4.7.2 Amplifikation.....	19
4.7.3 Transfektion.....	20
4.7.4 Analyse der Transfektionseffizienz und-persistenz	20
4.7.4.1 Mikroskopie	20
4.7.4.2 Durchflusszytometrie	20
4.8 Implantation.....	21
4.8.1 OP-Vorbereitung.....	21
4.8.2 OP	21
4.9 Explantation.....	22
4.10 Immunoblot.....	22
4.10.1 Proteinaufbereitung.....	22
4.10.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration.....	22
4.10.3 SDS-PAGE.....	23
4.10.4 Western-Blot	23
4.11 Immunhistochemie.....	24
4.11.1 Gewebeeinbettung	24
4.11.2 Herstellung der Schnitte.....	25
4.11.3 Entparaffinierung und Rehydrierung.....	25
4.11.4 HE-Färbung.....	26
4.11.5 Antikörperfärbung	26
4.11.6 Entwässern und Eindecken.....	27
4.12 Lichtmikroskopische Auswertung	28
4.13 Statistik	29
5 ERGEBNISSE.....	30
5.1 Das azelluläre, dermale Allo-Tx	30
5.2 Charakterisierung der Grenzflächenreaktion zwischen azellulärem, dermalen Allo-Tx und umliegendem Bindegewebe	31
5.2.1 Das Cytokinmilieu	31
5.2.1.1 Qualitative Resultate	31
5.2.1.2 Quantitative Resultate.....	32
5.2.2 Die Gewebereorganisation.....	33
5.2.2.1 Qualitative Resultate	33
5.2.2.2 Quantitative Resultate.....	35
5.2.3 Die Korrelation	37
5.2.4 Die Neovaskularisation des Allo-Tx	40
5.2.4.1 Qualitative Resultate	40
5.2.4.2 Quantitative Resultate.....	41
5.3 Nukleofektion-Eine effiziente Methode zur transienten Transfektion von Fibroblasten aus der oralen Mukosa der Ratte?	43
5.3.1 Transfektionseffizienz	43
5.3.2 Transfektionspersistenz	43
5.4 Therapeutische Angiogenese durch ex-vivo Genthherapie	45
5.4.1 Qualitative Resultate	45
5.4.2 Quantitative Resultate	45

5.4.2.1 Das VEGF-Profil	45
5.4.2.2 Die periimplantäre Gefäßsituation.....	47
5.4.2.3 Die Korrelation	48
5.4.2.4 Die Neovaskularisation des Allo-Tx	49
6 DISKUSSION	52
6.1 Das azelluläre, dermale Allo-Tx	52
6.2 Tiermodell	54
6.3 Charakterisierung der Grenzflächenreaktion zwischen azellulärem, dermalen Allo-Tx und umliegendem Bindegewebe	55
6.3.1 Das Cytokinmilieu	55
6.3.2 Die Gewebereorganisation.....	57
6.3.3 Die Neovaskularisation des Allo-Tx	60
6.4 Therapeutische Angiogenese durch ex-vivo Gentherapie	63
7 SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	64
8 LITERATURVERZEICHNIS	I
9 ANHANG	XIII
9.1 Originalarbeiten, Wissenschaftliche Vortraege und Poster, Preise	xiii
9.2 Ehrenwoertliche Erklaerung	xvi
9.3 Danksagungen.....	xvii

1 ZUSAMMENFASSUNG

Azelluläre, dermale Allo-Tx wurden für die Versorgung großflächiger Vollhautverbrennungen entwickelt und zunehmend auch in anderen Indikationsgebieten evaluiert. Der Einsatz zur Weichgewebeaugmentation kann anatomische wie krankheitsbedingte Limitationen im transplantierbaren Gewebe überwinden und gleichzeitig durch kürzere OP-Zeiten sowie den Verzicht auf eine zusätzliche Donorstelle den Behandlungskomfort für den Patienten erhöhen. Vorangegangene klinische Studien zeigten jedoch ein heterogenes Outcome. Zellkulturversuche, in denen eine Induktion von TGF-beta₁ durch die Allo-Tx nachgewiesen werden konnte, suggerierten eine kausale Rolle fibrotischer Prozesse bei der Entstehung chirurgisch revisionspflichtiger Situationen nach azellulärer Allo-Tx.

Basierend auf diesen Studien wurden Wistar-Ratten (n=10), bilateral in die Leistenregion, azellularisierte, dermale Allo-Tx implantiert. Während der Implantation und am 7. sowie 14. p. op. Tag wurden jeweils 10 Biopsate aus dem Heilungsbereich gewonnen. Die Explantate wurde mittels Western-Blot auf VEGF- und TGF-beta₁-Gewebekonzentration sowie mittels Immunhistochemie auf VEGF-, TGF-beta₁-, alpha-SMA- und CD105-Expression untersucht. Die histologischen Schnitte wurden lichtmikroskopisch ausgewertet, wobei der Labeling Index als Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl des Gesichtsfeldes bei 400×Originalvergrößerung für VEGF, TGF-beta₁ sowie alpha-SMA im periimplantären Bindegewebe bestimmt wurde. Die Gefäßzahl sowie die Gesamtfläche der Gefäßlumina pro Gesichtsfeld und der Anteil der Lumenfläche an der Gesamtgesichtsfeldfläche (Perfusionsverhältnis) peri- sowie intraimplantär wurden ermittelt. Mittels t-Test für unabhängige Variablen wurde auf signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten geprüft und durch den Pearson-Koeffizienten konnte eine Korrelation zwischen den Cytokinprofilen und den Gewebeparametern hergestellt werden.

TGF-beta₁_{periimplantär} zeigt ein profibrotisches Expressionsprofil mit einer signifikanten (p=0.000) Expressionssteigerung zwischen Implantation und 7. p.op. Tag gefolgt von einer signifikanten (p=0.000) Expressionsminderung zwischen Tag 7 und 14. Die alpha-SMA-Expression_{periimplantär} nimmt zwischen Implantation und 7. Tag signifikant zu (p=0.000), wobei eine stark positive Korrelation ($r_P=0.996$) mit der TGF-beta₁-Expression besteht. Diese Elevation zeigt bis zum 14. Tag Persistenz. VEGF_{periimplantär} zeigt über den gesamten Untersuchungszeitraum eine signifikante (p=0.000) Abnahme. Diese korreliert stark positiv ($r_P=0.885$) mit einer signifikanten Regression (p=0.028) der Lumenfläche periimplantärer Kapillaren bei signifikanter (p=0.029) Verschlechterung des Perfusionsverhältnisses_{periimplantär}. Innerhalb der Allo-Tx werden zwischen der Implantation und dem 7. p.op. Tag Gefäße

ausgebildet. Eine signifikante Verbesserung des Perfusionsverhältnisses ($p=0.048$) wird jedoch erst zwischen 7. und 14. p.op. Tag erreicht.

Derartige profibrotische Vorgänge an Materialgrenzflächen mit konsekutiv verzögerter, neovaskularisations-abhängiger Biointegration konnten auch von anderen Gruppen für diverse Weichgewebeersatzmaterialien verifiziert werden.

Vor diesem Hintergrund einer möglichen kausalen Beziehung zwischen unsicheren klinischen Ergebnissen und einer, im Tierversuch detektierbaren, profibrotischen Grenzflächenreaktion wurde im Weiteren die Möglichkeit einer modulatorischen Beeinflussung der Wundheilungsstörung durch therapeutische Angiogenese evaluiert.

Autologe Fibroblasten aus der oralen Mukosa der Ratte wurden mittels Nukleofektion transient mit GFP-/ VEGF-transfiziert. Wistar-Ratten wurde bilateral in die Leistenregion zum Zeitpunkt der Allo-Tx eine Suspension aus 5×10^5 autologen, nativen ($n=10$) beziehungsweise VEGF-transgenen ($n=10$) Fibroblasten injiziert. Nach 7 resp. 14 Tagen wurden je 10 Allo-Tx mit umliegendem Bindegewebe explantiert.

Durch transiente Nukleofektion wird eine Effizienz von 63.331% bei einer Persistenz der Transgenexpression von 9 Tagen erreicht. Transplantation autologer, nativer Fibroblasten hat keinerlei modulatorischen Einfluss im Heilungsbereich. Durch VEGF-transgene Fibroblasten wird eine signifikante Steigerung der VEGF-Expression ($p=0.000$) über den gesamten Untersuchungszeitraum erreicht. Das periimplantäre Perfusionsverhältnis kann dadurch aufrecht erhalten werden. Daraus resultiert eine signifikant ($p=0.045$) bessere Perfusion der Allo-Tx bereits ab Tag 7.

Durch therapeutische Angiogenese mittels VEGF-ex-vivo Gentherapie kann die fibrotische Reorganisation von Gefäßen im Heilungsbereich so moduliert werden, dass eine beschleunigte Neovaskularisation der Allo-Tx und damit eine bessere Biointegration erreicht wird.

2 EINLEITUNG

2.1 Azelluläre, dermale Allo-Tx

Die Therapie mit autologem Gewebe stellt den derzeitigen „Goldstandard“ in der Behandlung extra-und intraoraler Weichteildefekte dar.

Transplantierbares, autologes Gewebe ist jedoch grundsätzlich in seiner Verfügbarkeit durch die anatomischen Gegebenheiten der Spenderstelle limitiert. So kann zum Beispiel ein subepitheliales Bindegewebe-Tx dem gesunden Gaumen bis zu einer Maximalgröße von 32mm × 15mm ohne Gefahr der Verletzung des neurovaskulären Bündels entnommen werden (Monnet-Corti et al. 2006). Multiple Voroperationen, Systemerkrankung oder Bestrahlung führen durch Fibrosierung und Verminderung der Perfusion der Gewebe zu zusätzlichen Einschränkungen der Verfügbarkeit von Auto-Tx (Clark et al. 2003).

Die Transplantathebung verlängert die Operationsdauer und bedingt eine weitere Wunde. Wobei die Komplikationen an der Entnahmestelle die Morbidität der Akzeptorstelle zum Teil weit übersteigen. In einer Studie von Wood et al. berichteten zum Beispiel 90% der befragten Patienten mehr Schmerzen an der Wange durch Entnahme eines Schleimhaut-Tx empfunden zu haben als in der perinealen Region bei zeitgleicher Korrektur von urethralen Strikturen (Wood et al. 2004).

Azelluläre, dermale Allo-Tx wurden 1992 zur Überwindung der Probleme der Gewebelimitation und Spenderstellenmorbidity erstmalig beschrieben und in diversen klinischen wie prä-klinischen Studien evaluiert.

2.1.1 Klinische Studien

Eine ausreichende Zone fixierter, keratinisierter Gingiva ist nicht nur ästhetisch vorteilhaft sondern auch von großer Bedeutung für die Langzeitstabilität dentaler Implantate. Die partielle Vestibulumplastik mit Transplantation von Gaumenschleimhaut stellt eine gebräuchliche Methode zur gingivalen Augmentation dar. Harris berichtete in einer Kasuistik über starke Schmerzen und hohe Rezidivneigung nach Applikation eines azellulären Allo-Tx zur Verbreiterung der attached Gingiva um 4 Implantate. Die Histologie von Biopsien aus dem Heilungsbereich demonstrierte eine mangelnde Gewebeintegration (Harris 2001).

Eine randomisierte, kontrollierte Vergleichsstudie an 12 Patienten stellte ebenfalls einen, im Vergleich zur transplantierten Gaumenschleimhaut, signifikant geringeren Gewinn an api-coronaler Schleimhautbreite im 6 Monates-Follow-up dar (Wei et al. 2000). Im Gegensatz dazu sehen Batista et al. keine Unterschiede im Outcome zwischen autologer Gaumenschleimhaut und azellulärem, dermalen Allograft (Batista et al. 2001).

Gingivale Rezessionen weisen eine multifaktorielle Genese auf und werden in der Regel bilaminär durch einen coronaren Verschiebelappen mit Interposition eines freien Bindegewebe-Tx vom harten Gaumen gedeckt. In einer randomisierten, kontrollierten Studie konnten bei 30 Patienten mit Miller Klasse I und II Defekten eine signifikant verzögerte Heilung sowie eine signifikant höhere Rezidivrate nach Applikation eines Allo-Tx festgestellt werden (Paolantonio et al. 2002). Andere Autoren fanden jedoch eine gute Rezessionsdeckung von zirka 74% durch Allografts (Santos et al. 2005).

Rezidivierende, oro-nasale Fisteln stellen mit einer Inzidenz von 11 bis 23% die häufigste, Palatoplastik-assoziierte Komplikation mit hoher Therapieresistenz dar (Emory et al. 1997). Clark et al. berichteten in einer retrospektiven Studie über den persistenten Verschluss von 7 uni-oder bilateralen Gaumenspalten $\geq 15\text{mm}$ durch Interposition eines azellulären, dermalen Allo-Tx zwischen oralen und nasalen Schleimhautlappen im Rahmen einer Langenbeck-Plastik. Bei 4 Patienten kam es nach 10 Tagen zu einer oralen respektive nasalen Interponat-Exposition, wobei die freiliegenden Regionen blass und wenig vaskularisiert wirkten (Clark et al. 2003). Auch im Rahmen sekundärer sowie quartärer Palatoplastiken zum Verschluss persistenter oro-nasaler Fisteln konnten azelluläre Allo-Tx erfolgreich eingesetzt werden (Cole et al. 2006, Steele und Seagle 2006). Eine Evaluation der Auswirkungen der Interposition auf das Gaumenwachstum wurde bislang jedoch nicht durchgeführt.

Desweiteren wurden azelluläre, dermale Allo-Tx mit unterschiedlichem Erfolg in der Abdeckung großflächiger Brandwunden (Abenavoli 2005), als Spacer in der Korrektur von Unterlidretraktionen im Zustand nach Blepharoplastik (Li et al. 2005), zur Abdeckung von Bauchwandhernien (Gupta et al. 2006), zur Wangenaugmentation nach Parotidektomie (Sachsman und Rice 2007), zum Aufbau von Gewebedefekten in Folge linearer Sklerodermie (Robitschek et al. 2008) sowie zur Lippenaugmentation (Gryskiewicz 2000) verwendet.

2.1.2 Prä-klinische Studien

Wilshaw et al. verglichen in einer in-vitro Studie verschiedene Biomaterialien, die zur Reparatur von Bauchwanddefekten eingesetzt werden, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Sekretion verschiedener Mediatoren durch humane Mesothelzellen in Kultur. Durch azelluläre, dermale Allo-Tx wurde verglichen mit Kontrollen eine signifikant höhere Interleukin-(IL)-8- sowie TGF-beta₁-Sekretion induziert. Die Expression von Matrix-Metallo-Proteinase (MMP)-1 wurde herunterreguliert. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Expressionssteigerung für Plasminogen-Activator-Inhibitor-(PAI)-1 ermittelt werden (Wilshaw et al. 2008).

2.2 TGF-beta₁ und profibrotische Gewebereorganisation

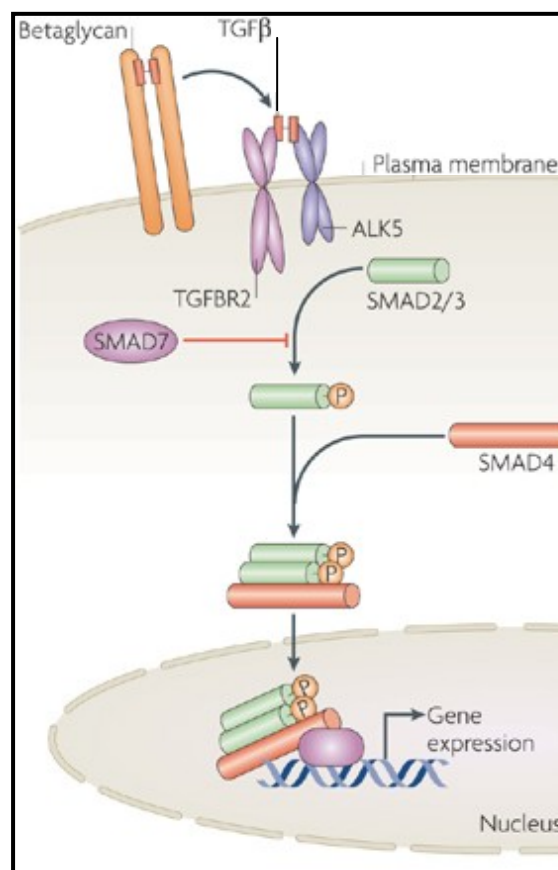


Abb. 1 Der TGF-beta₁-Smad-Signaling-Pathway (ten Dijke und Arthur 2007).

Die Rolle von TGF-beta₁ in der profibrotischen Bindegewebereorganisation ist am Beispiel der Einheilung freier, vaskularisierter Weichgewebe-Tx ins vorbestrahlte Lagergewebe gut charakterisiert.

Nach Transplantation eines myo-cutanen Grazilislappens in die, 4 Wochen vorher mit einer Referenzdosis von 30Gy bestrahlte, Halsregion der Wistar-Ratte konnte im heilenden Gewebe eine, im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, elevierte, loko-regionäre TGF-beta₁-Konzentration konstatiert werden (Schultze-Mosgau et al. 2002c).

TGF-beta₁ bindet an den konstitutiv aktiven Typ II-Rezeptor, der ebenfalls im vorbestrahlten Transplantationsgebiet hochreguliert ist (Schultze-Mosgau et al. 2003a). Nach Ligandierung von TGF-beta₁ komplexiert der TGF-beta-R-II mit dem TGF-beta-R-I (Alk-5), der durch Transphosphorylierung aktiviert wird. Alk-5 phosphoryliert die R-Smads (Smad2 und 3), die nach Komplexbildung mit dem Co-Smad (Smad4) in den Nucleus translozieren und dort die Transkription diverser Zielgene induzieren oder reprimieren (de Caestecker 2004). Smad7 wirkt als natürlicher Inhibitor des nukleoplasmatischen Shuttelings der R-Smads durch Hemmung der Komplexbildung zwischen Smad2/3 und dem Co-Smad (Abb.1), (Desmouliere et al. 1993).

Nach freiem, vaskulären Weichgewebettransfer konnte im vorbestrahlten Gebiet eine verstärkte Kernlokalisation aktivierter Smad2/3-Komplexe bei gleichzeitiger Verminderung cytosolischen Smad7 nachgewiesen werden (Schultze-Mosgau et al. 2004). Die im Vergleich zu Kontrollen erhöhte TGF-beta₁-Transduktion führte zu einer Abnahme zellulärer Elemente bei gleichzeitiger Zunahme von ECM-Bestandteilen im vorbestrahlten Heilungsgebiet. Die Matrix-Akkumulation konnte auf eine Prolyl-Hydroxyprolinase-beta-abhängige Überexpression von Kollagen I, III und IV (Schultze-Mosgau et al. 2004) bei gleichzeitiger Inhibition matrixdegradierender Enzyme durch die Induktion von Gewebeinhibitoren, wie PAI-I, zurückgeführt werden (Schultze-Mosgau et al. 2006). Die Folge waren perikapilläre Fibrose, irreguläre Kapillarverteilung sowie eine Reduktion der kapillären Lumenfläche im Transplantatlager (Schultze-Mosgau et al. 2002a, Schultze-Mosgau et al. 2002b).

2.3 Neovaskularisation

Angiogenese und Vaskulogenese sind im postnatalen Organismus an der Neovaskularisation beteiligt (Velazquez 2007). Während Angiogenese die Entstehung neuer Kapillaren aus vorbestehenden Gefäßen beschreibt (Carmeliet 2005), stellt Vaskulogenese die Formierung von kapillar-ähnlichen Strukturen aus EPCs dar (Sepulveda et al. 2007). Beide Vorgänge werden durch ein räumlich sowie zeitlich definiertes Wachstumsfaktorprofil gesteuert.

2.3.1 Angiogenese

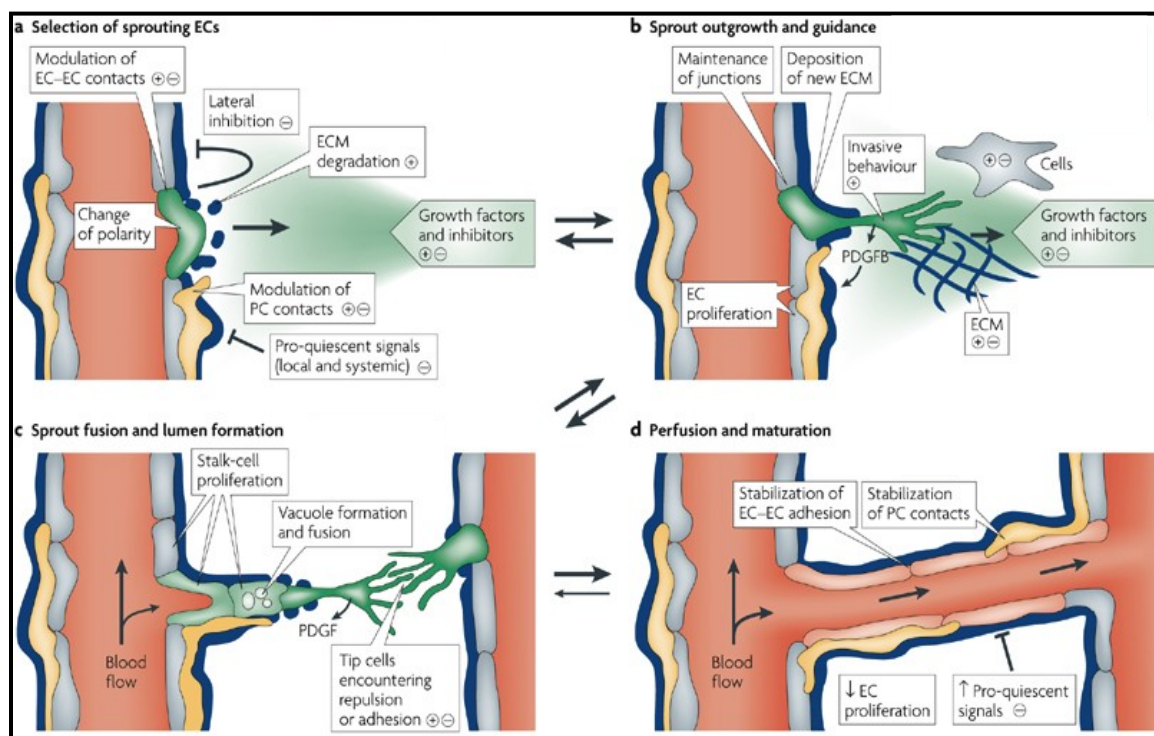


Abb. 2 Vorgänge bei der angiogenen Aussprossung (Adams und Alitalo 2007).

Die Aussprossung wird durch ein Übergewicht pro-angiogener Signalen, wie VEGF, initiiert. Zunächst werden Endothelzellen mit besonders hohem VEGF-Rezeptorbesatz selektiert. Die selektierten Zellen sezernieren einen Enzymcocktail, der die vaskuläre Basalmembran degradiert, verlieren ihre Polarität und lösen sich aus dem Gefüge der Gefäßwand (Abb. 2a). Der wachsende Spross wird durch einen VEGF-Gradienten zum Ort der Hypoxie geleitet und durch Rekrutierung von

Perizyten konsolidiert (Abb.2b). Durch Vakuolisierung der Zellen des Endothelstranges sowie anschließende Konfluktion der Hohlräume wird ein Lumen ausgebildet (Abb. 2c). Durch Inoskulation neu gebildeter Sprossen mit der autochthonen Vaskulatur entstehen neue Gefäßnetzze (Abb. 2d), (Adams und Alitalo 2007).

2.3.2 Vaskulogenese

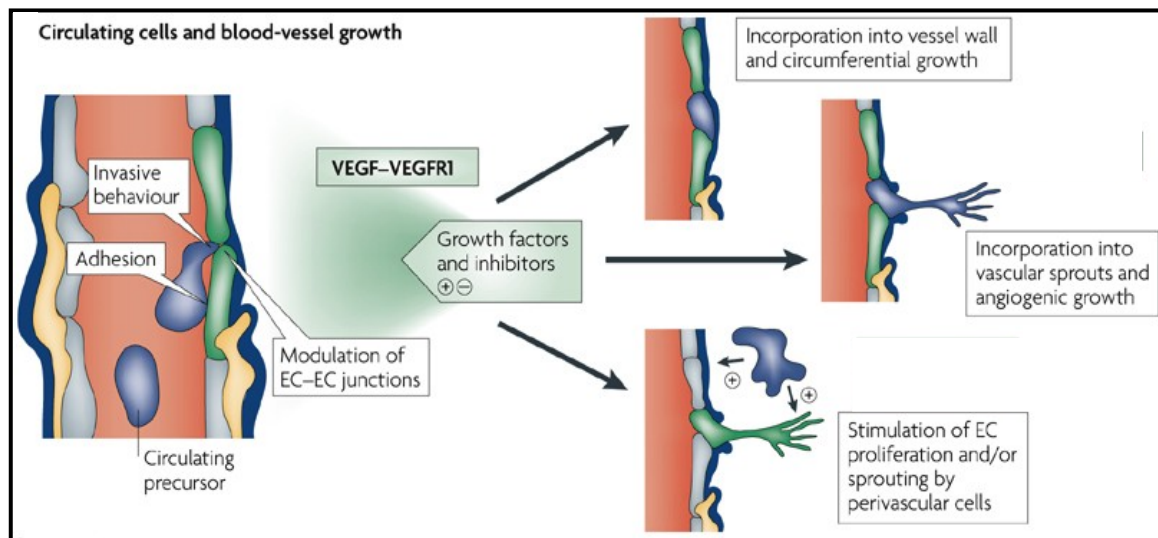


Abb. 3 Vorgänge bei der Vaskulogenese (Adams und Alitalo 2007).

Für die erfolgreiche Rekrutierung von EPCs aus dem Blutstrom muss das Endothel Hypoxie-bedingte Alterationen aufweisen, die eine Adhäsion sowie transendotheliale Migration der Stammzellen ermöglichen. Je nach Stimulation ist der Verbleib der rekrutierten EPCs sehr verschieden. Sie können direkt in die Gefäßwand eingebaut werden und zu einem zirkumferentiellen Wachstum beitragen oder aus der Kapillarwand aussprossen. Außerdem können die Zellen ins Interstitium übertreten und durch Wachstumsfaktorsekretion die Angiogenese protegieren (Abb. 3), (Adams und Alitalo 2007).

2.4 Therapeutische Angiogenese

Regression von Kapillaren im Transplantatlager konnte als Hauptursachen für eine niedrige Take-Rate nach Übertragung vaskularisierter Weichgewebe-Tx ins vorbestrahlte Lagergewebe identifiziert werden (Schultze-Mosgau et al. 2002a, Schultze-Mosgau et al. 2002b). Durch topische Applikation von VEGF konnte durch eine Induktion kollateraler Vaskularisation die Einheilungsrate im Tiermodell signifikant erhöht werden (Schultze-Mosgau et al. 2003b).

VEGF besitzt jedoch eine kurze Halbwertszeit von 30 bis 40min (Zhang et al. 2004), diffundiert rasch ins Blut (Kim und Burgess 2002), besitzt das Potential zur Induktion von Angiogenese in räumlich entfernten Körperregionen (Carmeliet 2005) und wirkt nur in einem engen Konzentrationsbereich (Ozawa et al. 2004).

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse ist für eine effiziente therapeutische Angiogenese ein Applikationssystem notwendig, dass eine lokalisierte, lang andauernde Wachstumsfaktorsekretion in einer definierten Konzentration ermöglicht (Rinsch et al. 2001). Verschiedene Systeme wurden beschrieben.

2.4.1 Gentherapie

Virale Vektoren sind sehr effiziente Systeme des Gentransfers. Trotz prä-klinischem Erfolg bestehen Sicherheitsbedenken hinsichtlich onkogenem, toxischen sowie immunogenen Potential (Cristiano 1998).

Nackte Plasmid-DNA zeigt nur geringe Effizienz bei Anwendung zur in-vivo Transfektion und eine Effizienzsteigerung durch Co-Applikation von Transfektionsreagenzien bedingt Gewebeschädigung durch Cytotoxizität (Kang et al. 2008).

Ex vivo Gentherapie hat sich als effektive Methode zur Applikation pro-angiogener Wachstumsfaktoren erwiesen. Transfizierte Zellen können in den ischämischen Bereich gebracht werden und dort die Neovaskularisation stimulieren. Zellen aus dem Ovar des chinesischen Hamsters wurden VEGF-transfiziert und in semipermeable Membranen enkapsuliert. 3 Wochen nach Implantation in das infarzierte Myokard einer Ratte konnte eine signifikant höhere Kapillardichte sowie besserer Herzfunktion festgestellt werden (Zhang et al. 2008). Außerdem konnte durch die s.c. Implantation VEGF-transfizierter EPCs die Überlebensfläche eines

überdimensionierten Rückenhautlappens im Nacktmausmodell erhöht werden (Yi et al. 2006).

2.4.2 Protein-Delivery

Aus degradierbaren Biomaterialien werden Wachstumsfaktoren passiv per diffusionem kontinuierlich über 3 Wochen mit initialem Burst freigesetzt (Elcin und Elcin 2006). Die Faktoren weisen jedoch eine Minderung ihrer biologischen Aktivität um rund 25% auf. Diese Aktivitätsminderung ist hauptsächlich auf azide Denaturierung durch die beim Abbau der Polymere entstehenden Säuren zurückzuführen (Kim und Burgess 2002).

Nach Implantation eines VEGF funktionalisierten Poly-(DL-Lactide-Co-Glycolide) Schwammes unter die Leistenfaszie der Ratte konnten Elcin et al. eine Neubildung von Kapillaren von der ersten Woche an beobachten. Die Kapillaren zeigten physiologische Morphologie bei einem mittleren Diameter von 10-30µm (Elcin et al. 2001). Desweiteren, konnten durch Co-Transplantation VEGF-beladener Mikrosphären Größe, Epithelisierungs-Grad sowie Perfusion eines im tissue-engineering hergestellten Darmes nach Implantation ins Omentum der Ratte signifikant erhöht werden (Rocha et al. 2008).

2.4.3 Zelltransplantation

Das Potential von EPCs nach Transplantation die Vitalität ischämischer Gewebe zu erhöhen konnte in diversen Studien gezeigt werden.

So fanden Park et al. zum Beispiel eine signifikant erhöhte Gewebeüberlebensrate im Modell des ischämischen Rückenhautlappens der Nacktmaus nach Transplantation humaner EPCs in das heilende Gewebe (Park et al. 2004).

3 ZIELE DER ARBEIT

Applikation azellulärer, dermaler Allo-Tx zur Weichgewebeaugmentation kann anatomische wie krankheitsbedingte Limitationen im transplantierbaren Gewebe überwinden und gleichzeitig durch kürzere OP-Zeiten sowie den Verzicht auf eine zusätzliche Donorstelle den Behandlungskomfort für den Patienten erhöhen. Die Ergebnisse bisheriger klinischer Studien sind jedoch kontradiktionär. In humanen Mesothelzellen konnte durch Kultur auf einem azellulären, dermalen Allo-Tx die Sekretion von TGF-beta1, einem Zytokin mit bekanntem profibrotischen Potential, induziert werden. Vor diesem Hintergrund ergeben sich zunächst folgende Fragestellungen:

1. Kommt es nach s.c. Implantation azellulärer, dermaler Allo-Tx in der Wistar-Ratte im umliegenden Bindegewebe zu einer Steigerung der Expression profibrotischer Cytokine bei gleichzeitiger Minderung der Expression proangiogener Faktoren?
2. Wird das umliegende Bindegewebe profibrotisch reorganisiert?
3. Wie korrelieren die Cytokinexpressionsprofile mit den Parametern der Gewebereorganisation an der Materialgrenzfläche nach Implantation?
4. Hat die Reaktion des periimplantären Gewebes einen Einfluss auf die Neovaskularisation des Allo-Tx?

Im Modell der Transplantation des myo-cutanen Graziislappens in die vorbestrahlte Halsregion der Wistar-Ratte konnte durch VEGF-Applikation eine Kollateralvaskularisation induziert werden, die profibrotische Heilungsstörungen effektiv antagonisierte. Zur wirkungsvollen Gabe pro-angiogener Faktoren sind jedoch Systeme der kontrollierten Freisetzung erforderlich. Durch Etablierung eines VEGF-Slow-Release-Systems wird folgende Frage beantwortet:

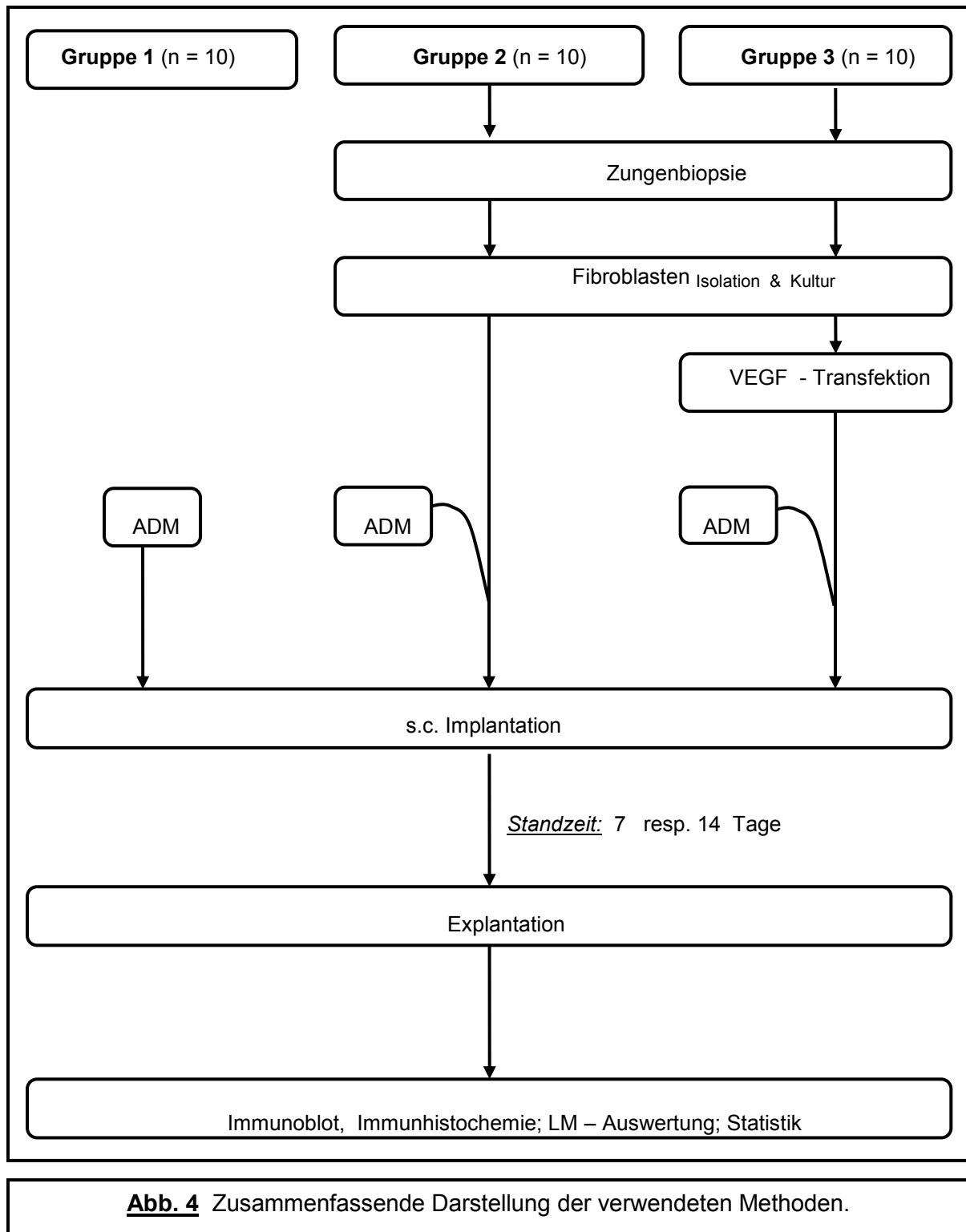
1. Welche Transfektionseffizienz-sowie persistenz kann bei Nutzung nicht-viraler Vektorsysteme bei Transfektion von Fibroblasten erreicht werden?

Im weiteren wird das VEGF-slow-release-System auf seine Effektivität in-vivo im Rattenmodell untersucht. Dabei werden folgende Problemstellungen evaluiert:

1. Wird durch Implantation VEGF-transgener, autologer Fibroblasten in den Heilungsbereich eines azellulären, dermalen Allo-Tx eine Erhöhung der VEGF-Expression erreicht?
2. Besteht ein Einfluss auf die Gefäßarchitektur im Heilungsbereich und die Neovaskularisation des Allo-Tx?

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Zusammenfassung



4.2 Versuchstiere

Im Rahmen vorliegender Studie wurden 30 männliche Albinoratten des Auszuchtstammes Wistar aus der Tierzucht des Institutes für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität, Jena verwendet. Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug zu Studienbeginn 3 Monate. Ihr Körpergewicht lag zwischen 300 und 400 g. Die Tiere wurden zur Identifikation mit Ohrmarkierungen versehen und während des Versuchszeitraumes einzeln in Makrolon Typ III-Käfigen (Techniplast, Varese, Italien) in den Räumen der Quarantäne des Institutes für Versuchstierkunde im Forschungszentrum Lobeda gehalten. Die Umgebungstemperatur lag bei $22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, die Luftfeuchte betrug 55%. Ein Luftaustausch von $12 \times$ pro Stunde, sowie ein Hell-Dunkelrhythmus von je 12 h waren gewährleistet. Die Tiere erhielten eine pelletierte Nagerstandarddiät (N° 1320, Altromin, Lage) und Leitungswasser ad libitum. Die Studie wurde auf Grundlage des, vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, genehmigten Tierversuchsantrags (Reg.-Nr. 02-12/05) und dessen angezeigter Änderung vom 13. Juli 2007 durchgeführt.

4.3 Biometrie

Die Versuchstiere wurden randomisiert in 3 Gruppen eingeteilt:

- (1) Gruppe 1 (n = 10): Tx
- (2) Gruppe 2 (n = 10): Tx+native Fibroblasten
- (3) Gruppe 3 (n = 10): Tx+VEGF-transgene Fibroblasten

Die Eingriffe erfolgten bilateral. Probenentnahmen fanden bei je 5 Tieren pro Gruppe nach 7 respektive 14 Tagen statt. Konsekutiv wurden zu jedem Entnahmezeitpunkt pro Gruppe 10 Transplantate explantiert.

4.4 Azelluläre, dermale Allo-Tx

4.4.1 Herstellung

Einer gesunden, 500g schweren, männlichen Wistar-Ratten, die vom Institut für Versuchstierkunde zur Tötung vorgesehen war, wurde nach Enthaarung ein rechteckiger, $6 \times 10 \text{ cm}^2$ großer Vollhautlappen vom Rücken entnommen. De-Epidermalisierung und Azellularisierung der Haut erfolgten gemäß der Methode nach Takami et al. (Takami et al. 1996).

Die Haut wurde zunächst in kreisrunde Stücke von 1 cm Durchmesser geschnitten. Diese wurden für 3 min in 70% (v/v) Ethanol desinfiziert. Zur weiteren Dekontamination erfolgte ein dreimaliges Waschen in antibiotisch/ antimykotischem PBS (pH 7.4; 0.25µg/ml Amphotericin B, 100 IU/ml Penicillin G, 100µg/ml Streptomycin; Gibco, Invitrogen, Paisley, UK). Nach Inkubation in 0.25% (w/v) Dispase II-Lösung (Dispase II in PBS, pH 7.4; Roche, Mannheim) über Nacht bei 4 °C konnte die Epidermis manuell entfernt werden. Es folgte die Inkubation in 0.5% (v/v) TritonX-100-Lösung (TritonX-100 in PBS; Merck, Darmstadt) für 24 h bei RT. Nach Auswaschen des Detergenz durch Inkubation in antibiotisch/ antimykotischem PBS (Gibco) für 24 h bei 4°C wurde die entstandene ADM bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C im Gefrierschrank asserviert.

4.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop besitzt aufgrund der Nutzung sehr kurzweiliger Elektronenstrahlen ein extrem hohes Auflösungsvermögen. Ein äußerst feiner, gesteuerter Elektronenstrahl tastet zeilenweise das Objekt ab. Im Gleichlauf mit diesem wird ein Elektronenstrahl einer Sichtrohre geführt, der das Bild zeilenweise vergrößert aufbaut. Die von jedem Objektpunkt mehr oder weniger stark reflektierten Elektronen werden einem Elektronenvervielfacher zugeführt und ergeben nach Verstärkung ein Helligkeitssignal, das die Intensität des Elektronenstrahls der Sichtrohre steuert. Es ergeben sich Objektbilder mit starker räumlicher Wirkung, welche die Oberflächenstrukturen des Objekts deutlich darstellen (Millington und Brown 1970).

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen wurden zur Feinanalyse der apikalen und vertikalen Präparatoberflächen durchgeführt. Die ADMs wurden zunächst auf Korkplatten befestigt und im Anschluss in 2.5% (v/ v) Glutaraldehyd in 0.1M Natriumcacodylat (pH 7.3) fixiert. Die weitere Aufbereitung und Untersuchungen der Proben erfolgte durch das Elektronenmikroskopische Zentrum am Institut für Pathologie.

4.5 Zungenbiopsie

4.5.1 Anästhesie

Das Gewicht der Versuchstiere wurde ermittelt (Tierwaage, Sartorius, Göttingen) und der Berechnung der Anästhetika-Dosis zu Grunde gelegt. Nach Sedierung mittels Ether-Dampf (Diethylether, Fischer, Saabrücken) erfolgte die i.p. Ketamin/ Xylazin-Mischinjektion:

- 109 mg/kg KG Ketamin (Ketavet®, Pharmacia & Upjohn, Erlangen)
- 12 mg/ kg KG Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen)

Die Narkosetiefe wurde an Hand des Zwischenzehenreflexes geprüft, wobei eine adäquate Tiefe im Schnitt nach 15 min erreicht wurde.

4.5.2 OP

Die Augen der Tiere wurden zum Schutz vor Austrocknung mit NaCl-getränkten Gazetupfern zugebunden. Zum Schutz vor Auskühlung wurden die Tiere im Anschluss in Seitenlage auf einem Plexiglas-OP-Brett fixiert.

Zu Beginn des Eingriffes wurde die Zunge mit Hilfe eines 6-0-Traktionsfadens (Ethilon, Ethicon, Norderstedt) aus der Maulhöhle heraus verlagert und mit Chlorhexamed®-Lösung (Gsk consumer health care, Bühl) desinfizierend abgerieben. Durch Injektion von 0.05 ml physiologischer Kochsalzlösung mit einem Adrenalin - Zusatz von 1 : 10 000 (Jenapharm, Jena) wurde die Mukosa prä. op. vom submukosalen Gewebe abgehoben. Zusätzlich wurde eine Konstriktion der Gefäße erreicht. Nach Einlegen einer saugfähigen Tamponade (Lohmann & Rauscher, Rengsdorf) in den Rachenraum zur Vermeidung der Aspiration von Blut

wurde unter dem OP-Mikroskop (OPMI-1-FR, Zeiss, Jena) ein rund 2mm × 5mm großes Mukosa-Stückchen vom lateralen Zungenrand entnommen (Abb. 5). Das Wundbett wurde nach sorgfältiger Reinigung und Blutstillung der freien Granulation überlassen.

Die entnommenen Gewebeproben wurden in sterilem, antibiotisch-antimykotischem PBS (Gibco) für maximal 2 Tage bei 4 °C bis zur weiteren Aufbereitung asserviert.

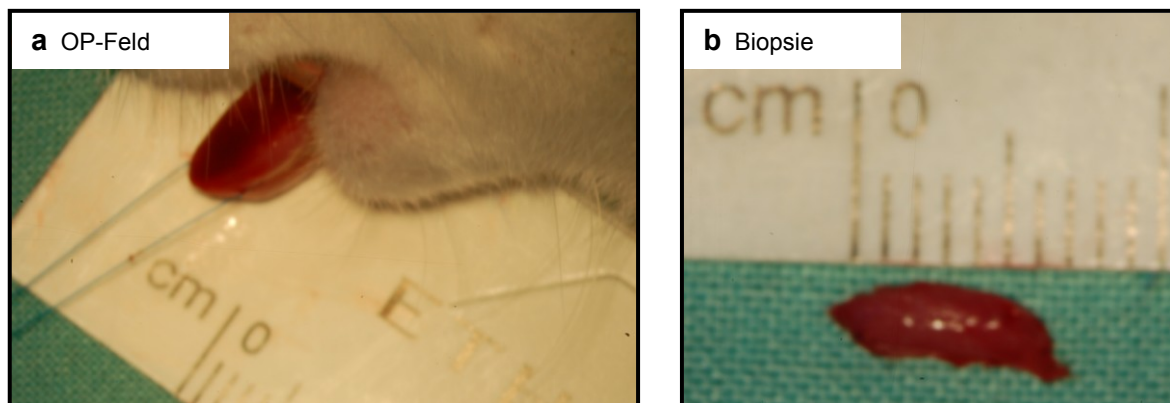


Abb. 5 Entnahme einer Biopsie aus der dorso-lateralen Lingualmukosa.

4.5.3 Postoperative Nachsorge

Zum Schutz vor Eigenverletzung wurden den Tieren unmittelbar p.op. die Zähne gekürzt. Desweiteren wurde am 1. p.op. Tag eine Schmerzmedikation durch s.c. Injektion von Metamizol (HEXAL, Holzkirchen) in einer Dosis von 50 mg/ kg KG vorgenommen.

4.6 Aufbereitung der Biopsie

4.6.1 Separation des Epithels vom Bindegewebe

Die Biopsien wurden mit der Epithelseite nach unten in einer 6-Loch-Platte (Greiner Bio-one, Frickenhausen) platziert und zur Reduktion der Kontamination mit Bakterien, Pilzen und Mykoplasmen 3× mit antibiotisch-antimykotischem PBS (Gibco) gewaschen.

Es erfolgte die enzymatische Desintegration durch Inkubation in 0.25% (w/v) Dispase II-Lösung (Roche, Mannheim) über Nacht bei 4 °C. Die Gewebestückchen wurden anschließend mit der Bindegewebeseite nach unten in eine frische 6-Loch-

Platte überführt und mit wenigen Tropfen PBS (Gibco) befeuchtet. Das Epithel konnte nun mit zwei gebogenen Mikropinzetten (Martin, Solingen) vom Bindegewebe abgezogen werden.

4.6.2 Isolation und Primärkultur mukosaler Fibroblasten

Das Epithel wurde verworfen, das Bindegewebe in einer frischen 6-Loch-Platte ausgebreitet und mit 2ml 0.2% (w/v) Collagenase-A-Lösung (Roche, Mannheim) überschichtet.

Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30min. Durch Zentrifugation (Multifuge 3L-R, Thermo, Lengenselbold) bei 1500 U/min für 5min wurden die Zellen sedimentiert, sodass der Überstand abgenommen werden konnte. Das Zellpellet wurde im Anschluss in 2ml D-MEM/ 10% FCS (Gibco) aufgenommen und erneut bei 1500 U/min für 5min zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1ml D-MEM/ 10% FCS (Gibco) resuspendiert und in eine unbehandelte 25cm² – Zellkulturflasche (Greiner Bio-one, Frickenhausen) transferiert. Im Anschluss wurde die Fibroblastensuspension mit 5ml vorgewärmtem D-MEM/ 10% FCS (Gibco) überschichtet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ unter einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre (CO₂-Inkubator, HERAcell® 150, Thermo, Langenselbold). Nach 48h erfolgte der erste Mediumwechsel, danach 2 Mal wöchentlich.

Die Zellen wurden morphologisch an Hand ihrer Spindelform identifiziert und erreichten nach durchschnittlich 7 Tagen eine 80%ige Konfluenz (Abb. 6).

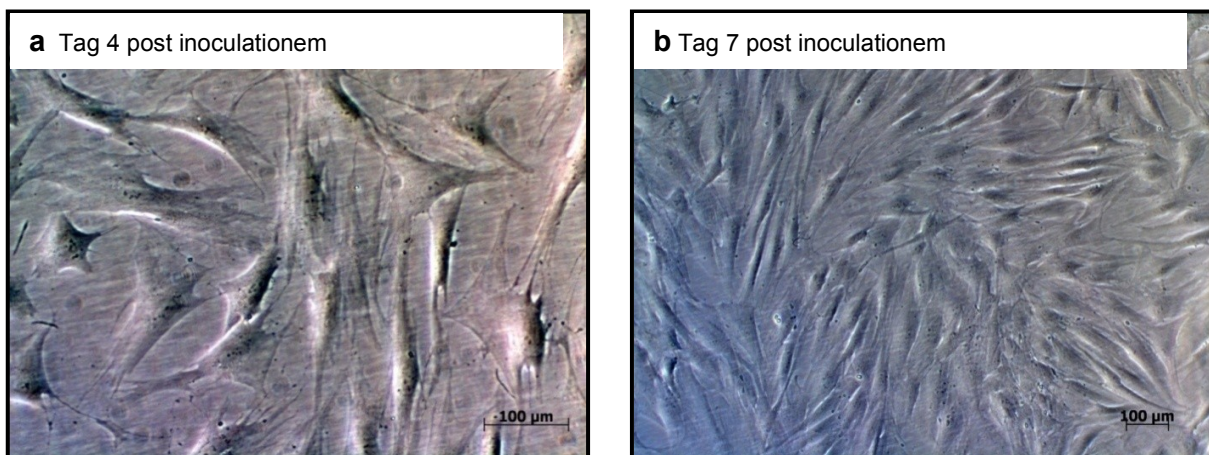


Abb. 6 Phasenkontrastaufnahmen einer primären Fibroblastenkultur, Originalvergrößerungen 200× (a); 100× (b).

4.6.3 Passage

Nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurde das Kulturmedium abgenommen und der Zellrasen zur Dekontamination 1× mit antibiotisch-antimykotischem PBS (Gibco) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0.25% (w/v) Trypsin-Lösung (Gibco) bei 37°C inkubiert. Zur Neutralisierung der Trypsinaktivität wurden nach 5min 5ml FCS-Lösung (Gibco) zugegeben. Nach Zentrifugation für 5min bei 1500 U/min wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellett in 500µl PBS (Gibco) resuspendiert und die Zahl vitaler Zellen mittels Neubauer- Zählkammer ermittelt.

4.6.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden in der modifizierten Neubauer-Zählkammer (Neubauer-improved, Brand, Wertheim) gezählt.

Auf einer Glasplatte sind auf einem leicht abgesenktem Mittelstreifen zwei gegenüberliegende quadratische Zählnetze (Abb.7b) eingraviert. Durch Aufbringen eines Spezial-Deckglases entsteht eine definierte Kammerhöhe von exakt 0.1 mm (Abb. 7a). Das Zentrum der kreuzförmig verstärkten Glasgravur stellt das so genannte Thoma-Netz (Abb.7c) dar. Das Zählnetz von 3 mm Seitenlänge und 9 mm² Fläche enthält Großquadrate mit je 1 mm² Fläche. In den vier sich diagonal gegenüberliegenden nicht vom Thoma-Netz durchzogenen Großquadraten wurden die Zellen gezählt.

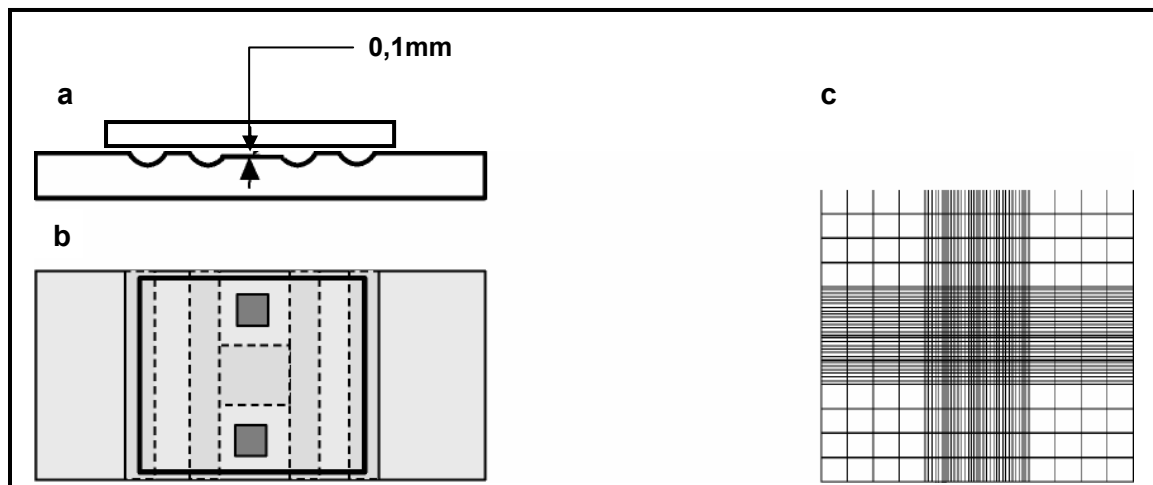


Abb. 7 Aufbau der Neubauer-Zählkammer im Querschnitt (a), in Aufsicht (b) sowie Aufbau eines Zählnetzes (Zeile et al. 1983).

Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension ergab sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times 10^4}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}}$$

4.7 Gentechnologische Arbeiten

4.7.1 Plasmide

Das kommerziell erhältliche Plasmid pmaxGFPTM (3486bp), (AMAXA Biosciences, Köln) ist ein eukaryotischer Expressionsvektor, der für das, aus *Pontellina plumata* isolierte, grüne Fluoreszenzprotein kodiert. Der Reporter maxGFPTM steht unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Cytomegalieviruspromotors.

Für die 164 Aminosäuren lange, rattenspezifische VEGF-Isoform kodierende cDNA wurde vom Institut für Pathologie, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg (AG Prof. Amann) im pGEM-3Zf(+)-Vektor zur Verfügung gestellt. Unter Nutzung des Gateway[®]-Klonierungsverfahrens (Invitrogen) erfolgte durch die Arbeitsgruppe der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie,

Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg (AG Prof. Schultze-Mosgau) die Umklonierung der bezeichneten Sequenz in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/nV5-DEST™ (7136bp), (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

4.7.2 Amplifikation

Chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien des Stammes DH5 α (Library Efficiency® DH5 α ™ Competent Cells, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurden für 30min auf Eis aufgetaut. 100 μ l dieser Zellen wurden zusammen mit 1 μ l Plasmid-Verdünnung (10ng/ μ l Plasmid in Tris-EDTA-Puffer, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) in Polypropylene-Tubes (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Hitzeschocktransformation der Bakterien durch Inkubation im Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) bei 42°C für 45 sek. Nach Inkubation für 2 min auf Eis wurden 0.9ml SOC-Medium (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugegeben. Es folgte die Inkubation im Schüttelinkubator für 1h bei 37°C und 225rpm. 100 μ l der Lösung wurden auf eine LB- (LB-Agar, Lennox, pH 7,0; BD Difco™, Sparks, MD, USA) Kanamycin (pmaxGFP)/ Ampicillin (pcDNA-VEGF) (Invitrogen, Paisley, UK) –Agar–Platte aufgetragen. Die Platte wurde über Nacht im Inkubator bei 37°C kultiviert.

Eine Bakterien-Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, in 5 ml LB–Ampicillin–Medium resuspendiert und für 8 h im Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. 2.5ml dieser Lösung wurden mit 150ml LB–Medium (BD Difco™, Sparks, MD, USA) verdünnt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Durch Zentrifugation bei 1500 U/min bei 4°C für 15min wurden die Bakterien pelletiert. Danach erfolgte die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den Bakterien gemäß EndoFree Maxi-Protokoll (Qiagen, Hilden).

4.7.3 Transfektion

Bei Transfektion mit dem AMAXA-System wird die DNA durch kurzfristige Depolarisation der Membranen, ausgelöst durch einen elektrischen Impuls, bis in den Kern der Zelle geschleust. Der Vorgang wird vom Hersteller als Nukleofektion bezeichnet.

Nach der Passage (4.6.3) wurden 5×10^5 Zellen und 3µg pcDNA-VEGF/ pmaxGFP control plasmid in 100µl Nukleofektionslösung (Basic Nucleofector Kit For Primary Mammalian Fibroblasts/ Dermal Fibroblast Kit, AMAXA, Köln) in einer Elektroporationsküvette aufgenommen. Danach erfolgte die Elektroporation (Nukleofektor I, AMAXA, Programm U-23/P-22). Nach der Transfektion wurden die Zellen umgehend in D-MEM/ 10% FCS (Gibco) aufgenommen und 24 h in einer 6-Well-Platte (Greiner) weiter kultiviert.

4.7.4 Analyse der Transfektionseffizienz und-persistenz

Sämtliche Analysen zu Effizienz und Persistenz des Transfektionsvorganges wurden als Triplikate ausgeführt.

4.7.4.1 Mikroskopie

Die nativen Zellen wurden täglich unter dem inversen Mikroskop Axiovert40CFL (Zeiss, Oberkochen, Germany) qualitativ auf Transgen-Expression untersucht.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde, der für den Farbstoff GFP geeignete, Filtersatz 16 (Anregung: BP 485/20, Strahlenteiler: FT 510, Emission: LP 515; Zeiss) verwendet. An Tag 1 bis 9 post nucleofectionem wurden randomisiert selektierte Ausschnitte bei 100× Originalvergrößerung digitalisiert (AxioCam, Zeiss).

4.7.4.2 Durchflusszytometrie

Vom ersten Tag post nucleofectionem an wurden täglich bis zum 9. Tag Kulturen abgebrochen. Die Zellen wurden trypsinisiert (4.6.3), in 400µl PBS (Gibco)

aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie (FACS Calibur, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) auf GFP-Transgen-Expression untersucht.

Die Zellen wurden mit einem Argon-Laser (488nm) angeregt. Die Fluoreszenz der Wellenlänge 525nm, die FL1-Height (FL1-H) wurde gemessen. Mindestens 10 000 Ereignisse wurden pro Probe ausgewertet.

4.8 Implantation

4.8.1 OP-Vorbereitung

Die Tiere wurden in der unter 5.5.1 beschriebenen Weise narkotisiert und danach in Rückenlage auf Plexiglas-OP-Brettern fixiert. Im Anschluss wurde die Leistenregion bilateral enthaart und mit Softasept®N (Braun, Melsungen) desinfizierend abgerieben.

Außerdem wurden für die Tiere aller Gruppen pro Individuum 2 ADMs aufgetaut. Für die Tiere aus Gruppe 2 und 3 wurden zusätzlich pro Individuum 2 Einzelspritzen (Omnifix®-F, Braun, Melsungen) mit 5µl PBS mit 5×10^5 (Ozawa et al. 2004) autologen, nativen (Gruppe 2) respektive VEGF-transgenen Fibroblasten (Gruppe 3) vorbereitet. Zur Vermeidung vaskulärer Irritationen wurden sämtliche Implantatmaterialien, ADM und Zellen, auf 37°C vorgewärmt.

4.8.2 OP

Der Oberschenkel wurde längs-medial von der Symphyse bis zur Tibia inzidiert. Im Anschluss wurde die Haut nach lateral mobilisiert und die ADM nach lateral oben in die Leistenregion geschoben. Es wurde besonders darauf geachtet, dass kein Kontakt zwischen den Membranen und der Inzision entsteht. Dem Wundrand wurde eine kleine Hautprobe zur Kryokonservierung entnommen. Im Anschluss wurde die Inzisionswunde mit fortlaufender Naht spannungsfrei verschlossen (Mariderm 4-0, Catgut, Markneukirchen). Zum Abschluss erfolgte bei den Gruppen 2 und 3 die transcutane Zellinjektion an 3 verschiedene Stellen in den Bereich der transcutan palpablen ADM.

4.9 Explantation

Die Tiere wurden durch Hyperinsufflation mit Ätherdampf (Diethylether, Fischer, Saarbrücken) getötet. Die ADM wurde durch die Haut palpiert und in einem Radius von 0.5 cm um das Implantat transcutan exzidiert. Die Implantate wurden in 4%iges Formalin eingelegt. Zusätzlich wurden kleine Stücke des periimplantären Bindegewebes in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.10 Immunoblot

4.10.1 Proteinaufbereitung

Aus jedem gefrorenen Bindegewebestück wurden am Kryomikrotom (Leica) ungefähr 50 konsekutive, 20µm dicke, Schnitte hergestellt und in eiskalten RIPA-Puffer (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) aufgenommen. Im Anschluss wurde die Lösung 20-30 sek gevortext (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA), für 1min bei 1500 U/min bei 4°C zentrifugiert, für 15min im Ultraschallbad in Eiswasser inkubiert, für weitere 40min in Eiswasser inkubiert, gevortext und erneut für 5min bei 1500 U/min bei 4°C zentrifugiert.

4.10.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bicinchoninsäure-Assays (BCA-Assay), (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) durchgeführt.

Der Assay beruht auf der Bildung von Cu^{2+} -Komplexen mit den vorhandenen Proteinen unter alkalischen Bedingungen, was zu einer Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^{1+} führt. Die reduzierte Menge des Kupfer(II) ist proportional zu der vorhandenen Menge an Protein. Bicinchoninsäure bildet im Alkalischen einen violetten bis blauen Komplex mit Kupfer(I), der bei der Messung der Optischen Dichte bei 562nm (OD562) mit dem ELISA-Reader nachgewiesen werden kann. Der lineare Bereich des BCA-Assays, in dem die Farbentwicklung proportional zur Proteinmenge ist, liegt zwischen 200-1000

microg/ ml. Als Vergleichsstandard mit bekannten Proteinkonzentrationen (Eichkurve) wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA angesetzt.

4.10.3 SDS-PAGE

Proteine können unter denaturierenden Bedingungen in Polyacrylamidgelen ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die eigene Polarität der Proteine durch geladene Aminosäurereste ist unerheblich, da sich sowohl im Probenpuffer als auch im Gel Natriumdodecylsulfat (SDS) befindet, das sich unabhängig von der Aminosäuresequenz an Proteine anlagert. Aufgrund der negativen Ladung des SDS wandern alle Proteine zur Anode. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (Invitrogen) und „Reduzierendem Agens“ (Invitrogen) versetzt und für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Taschen des Minigels (Invitrogen) wurden mit Laufpuffer gespült. Die Proben sowie ein Größenstandard (MagicMark, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurden geladen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 200 V für 50-60 min im „XCell Sure Lock System“ (Invitrogen) durchgeführt.

4.10.4 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektroblood aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-C-Extra, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) überführt.

Dazu wurden eine Nitrocellulose-Membran, zwei Filterpapiere und 4 Blotschwämme für 10 min in Transferpuffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) äquilibriert. Für den Blot wurden von der Kathode aus zwei Blotschwämme, ein Filterpapier, das Gel, die Nitrocellulose-Membran, ein Filterpapier sowie zwei weitere Blotschwämme luftblasenfrei zusammengelegt und in die Apparatur (XCell II Blot Module, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eingebaut (Abb. 8). Der Transfer fand bei konstanter Spannung von 30 V für 60 min statt.

Nach der Transferzeit wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit Blotto (TBS, 0.1% Tween, 100µg/ml Magermilchpulver; Merck, Darmstadt) geblockt. Nach einem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (unkonjugierter, monoklonaler Maus-anti-TGF-beta₁-IgG1, Abcam, Cambridge, UK,

1:1000/ unkonjugierter, monoklonaler Maus-anti-VEGF-IgG1, Abcam, Cambridge, UK, 1:2000) über Nacht, bei 4°C auf dem Schüttler. Nachfolgend wurde mit einem mit einem biotinylierten, polyklonalen Ziege-anti-Maus Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1 : 2000 für 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Die chromogene Kopplung erfolgte durch Inkubation mit AB-HRP-Komplex (Dako, Carpinteria, CA, USA) für 30min bei RT. Im Anschluss wurde für 1 min mit Luminol-Reagenz (ECL-WB-Detection Reagent, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) inkubiert. Die Blots wurden mit Hilfe eines Chemolumineszenz-Detektions-Systems (ECL, Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany) entwickelt. Zum Nachweis identischer Proteinladung wurde zusätzlich eine beta-Aktin-Färbung (Verdünnung 1:100, Biozol) durchgeführt.

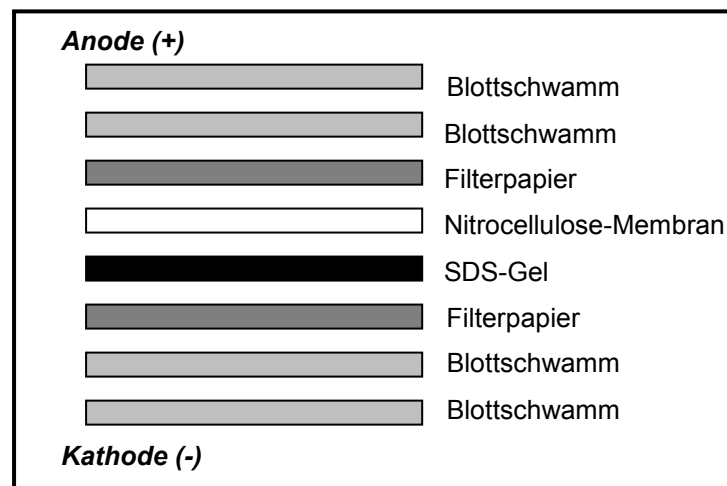


Abb. 8 Zusammenbau der Blot-Apparatur gemäß Hersteller-Protokoll.

4.11 Immunhistochemie

4.11.1 Gewebereinbettung

Zur Stabilisierung der Gewebestruktur durch Vernetzung der Eiweißmoleküle wurden die Explantate in 4% Formalin bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Danach wurden sie in Filterpapier (Mediate, Burgdorf) gewickelt in Einbettkassetten (Mediate, Burgdorf) gelegt. Nach Entfernung überschüssiger Fixierlösung durch einen 4½ stündigen Waschschrift in Leitungswasser wurden die Proben in einer

aufsteigenden Alkoholreihe (Tab. 1) im Gewebeeinbettautomaten (Histokinette, Leica, Nussloch) entwässert.

Abschließend wurden die Proben in Paraffin (Paraffinausgießstation, EG 1160, Leica, Nussloch) ausgegossen.

Substanz	Dauer
Ethanol, 70%, I	60min
Ethanol, 70%, II	60min
Ethanol, 96%, I	60min
Ethanol, 96%, II	60min
Ethanol, 100%, I	60min
Ethanol, 100%, II	60min
Ethanol, 100%, III	60min
Xylol/ Alkohol	60min
Xylol I	60min
Xylol II	60min

Tab. 1 Einbettprogramm (Dehydrierungskette).

4.11.2 Herstellung der Schnitte

Die Paraffinblöcke wurden aus den Gießförmchen ausgebettet. Mit dem Mikrotom (RM2145, Leica, Nussloch) wurden drei vertikale, aufeinanderfolgende, 3 microm dicke Schnitte hergestellt. Diese drei Cluster wurden auf einen gemeinsamen Objektträger (Menzel, Braunschweig) aufgezogen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank (T6060, Heraeus, Hanau) getrocknet.

4.11.3 Entparaffinierung und Rehydrierung

Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden und Bindungsstellen für Antikörper freizulegen wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (Tab. 2) entparaffiniert und rehydriert.

Substanz	Dauer
Xylol, 100%, I	10min
Xylol, 100%, II	5 bis 10min
Ethanol, 100%, I	1min
Ethanol, 100%, II	1min
Ethanol, 96%	1min
Ethanol, 80%	1min
Ethanol, 60%	1min
Ethanol, 50%	1min

Tab. 2 Entparaffinierungskette.

4.11.4 HE-Färbung

Die Schnitte wurden für 25min in Hämalaun nach Mayer (1mg/ml Hämatoxylin, 200 microg/ml Natriumjodat, 50mg/ml Kalialaun, 50mg/ml Chloralhydrat, 1mg/ml Zitronensäure; Merck, Darmstadt) inkubiert, 5-10 min in Leitungswasser und im Anschluss in dAqua gespült. Es erfolgten die Inkubation in Eosin (1mg/ml Eosin; Merck) und die Spülung in dAqua.

4.11.5 Antikörperfärbungen

Durch Inkubation in 3% (v/v) H₂O₂-Lösung (Merck, Darmstadt) bei Zimmertemperatur für 20min wurde die endogene Peroxidase-Aktivität geblockt. Nach dreimaligem Spülen mit TBS-T (Dako, Carpinteria, CA, USA) wurden die relevanten Epitope durch Inkubation in Citratpuffer (Dako, Carpinteria, CA, USA) bei 90°C für 25min demaskiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Präparate im Anschluss bei Zimmertemperatur für 30min in Blotto (TBS, 0.1% Tween, 100 microg/ml Magermilchpulver; Merck, Darmstadt) inkubiert.

Die Markierung von CD105 erfolgte durch Inkubation mit einem unkonjugierten, monoklonalen Maus-IgG₁ kappa (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1 : 25 für 16 h bei 4°C. Der Antikörper reagiert spezifisch mit der humanen Isoform von CD105 (Endoglin) zeigt nach Schultze-Mosgau et al. jedoch auch Kreuzreaktivität mit der Rattenisoform (Schultze-Mosgau et al. 2003). Zur Markierung von alpha-SMA wurde ein monoklonaler, unkonjugierter Maus-IgG₂ kappa (Dako,

Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:75 für 30min bei RT eingesetzt. Für die Detektion von TGF-beta₁ wurde ein monoklonaler Maus-IgG₁ (Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:50 für 30min bei RT eingesetzt. Der Nachweis von VEGF erfolgte mit einem monoklonalen, unkonjugierten Maus-IgG1 (Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:75 für 30min bei RT.

Nachfolgend wurde mit einem biotinylierten, polyklonalen Hase-anti-Maus Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1 : 250 für 30 min bei RT inkubiert. Die chromogene Kopplung erfolgte durch Inkubation mit AB-HRP-Komplex (Dako, Carpinteria, CA, USA) für 30min bei RT. Im Anschluss wurde für 10min bei RT mit DAB-Chromogen (Dako, Carpinteria, CA, USA) inkubiert. Zur Kontrastverstärkung wurden die Kerne mit Hämalaun für 5min bei Raumtemperatur gegengefärbt. Im Anschluss wurde mit destilliertem Wasser gespült.

Eine Sensitivitätskontrolle der Immunreaktion wurde durch Mitführen von Nierengewebe als externe Positivkontrolle in jedem Färbegang gewährleistet.

Pro Objektträger wurde zur Prüfung der Spezifität des Färbevorganges eine Negativkontrolle mitgeführt. Dazu wurde an Stelle des Primärantikörpers nur mit Antibody-Diluent (Dako, Carpinteria, CA, USA) inkubiert.

4.11.6 Entwässern und Eindecken

Da DAB nicht alkohollöslich ist konnten die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tab. 3) entwässert und mit Kunstharz (Eukitt) eingedeckt werden.

Substanz	Dauer
Ethanol, 50%	1 min
Ethanol, 60%	1 min
Ethanol, 80%	1 min
Ethanol, 96%	1 min
Ethanol, 100%, I	1 min
Ethanol, 100%, II	1 min
Xylol, 100%, I	1 min
Xylol, 100%, II	1 min

Tab. 3 Dehydrierungskette.

4.12 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Schnitte wurden qualitativ bei einer 50 bis 400 \times Originalvergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) auf Verteilung und Gestalt kapillarartiger Strukturen sowie TGF-beta₁, VEGF- und alpha-SMA-positiver Zellen untersucht.

Die quantitative Auswertung wurde unter Nutzung der Methode des randomised, systematic subsampling nach Weibel durchgeführt (Weibel 1989). Das heißt pro Schnitt wurden zufällig 3 peri-sowie 3 intraimplantäre Gesichtsfelder bei einer 400 \times Originalvergrößerung digitalisiert (AxioCam, Zeiss, Oberkochen).

Die Gesamtzahl kapillarartiger Strukturen wurden für jedes Gesichtsfeld ermittelt. Außerdem wurde unter Nutzung eines Histomorphmetrieprogrammes (AxioVision Rel.4.5, Zeiss, Oberkochen) die Gesamtfläche kapillärer Lumina pro Gesichtsfeld bestimmt (Abb. 9) sowie deren Anteil an der Gesamtgesichtsfeldfläche errechnet. Als Kriterium für ein Gefäß wurden ein zentrales Lumen sowie eine randständige, kontinuierliche Schicht CD105-positiver Zellen definiert.

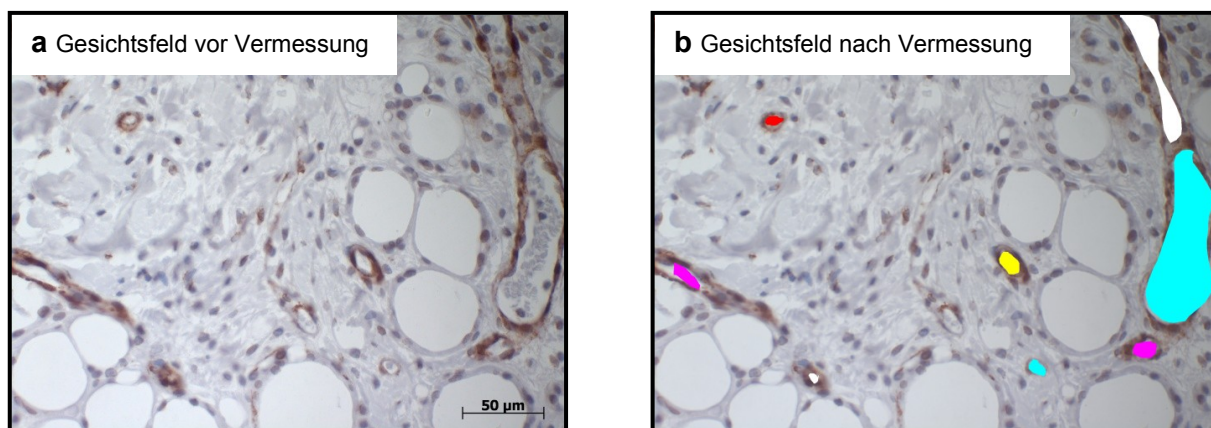


Abb. 9 Methodik der lichtmikroskopischen Auswertung, Originalvergrößerung: 400 \times .

Zusätzlich wurden in den periimplantären Gesichtsfeldern der TGF-beta₁, VEGF- und alpha-SMA-Schnitte Gesamtzellzahl sowie Zahl positiv exprimierender Zellen bestimmt. Der Labeling-Index, als Anteil positiv exprimierender Zellen an den Gesamtzellen des visuellen Feldes, wurde aus diesen Werten errechnet.

4.13 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung (SA) angegeben. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels Bar-sowie Dot-Line-Plot. Die Werte der 3 Gruppen wurden nach Feststellung der Normalverteilung sowie Gleichheit der Varianz mittels t-Test für unabhängige Variablen auf signifikante Unterschiede getestet. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p-Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant betrachtet. Der Pearson-Korrelationskoeffizient (r_P) sowie das Bestimmtheitsmaß (r^2) wurden berechnet. Alle Berechnungen erfolgten mit dem Programm SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

5 ERGEBNISSE

5.1 Das azelluläre, dermal Allo-Tx

Durch kombinierte Enzym- und Detergenz-Behandlung mit Dispase II und Triton-X-100 werden aus dorsaler Rattenvollhaut sämtliche epidermalen sowie dermalen Zellen und Zellfragmente herausgelöst (Abb. 10). Die typische Polarisierung der Haut bleibt jedoch auch nach Azellularisierung erhalten (Abb. 10b).

Die apikale Oberfläche zeigt papilläre Faltungen, die durch die azellulären Reteleisten des Stratum papillare aufgeworfen werden. Lochartige Einziehungen entstehen aus azellularisierten Haarfollikel oder assoziierten Drüsenausführungsgängen. In Folge des vollständigen Erhalts der Basalmembran ist die Oberfläche homogen und glatt. An keiner Stelle kommt es zur Exposition dermalen Kollagenfasern (Abb. 10a).

Die Dermis imponiert durch ein dicht verwobenes Netzwerk von Fasern. Dieses Netzwerk zeigt im basalen Bereich Auflockerungen. Zusätzlich sind in dieser Region runde, lumenhaltige Strukturen zu erkennen. Dabei könnte es sich um azellularisierte Perforansgefäße handeln, die aus dem darunterliegenden Gewebe des Panniculus carnosus in die Haut abzweigen (Abb. 10b).

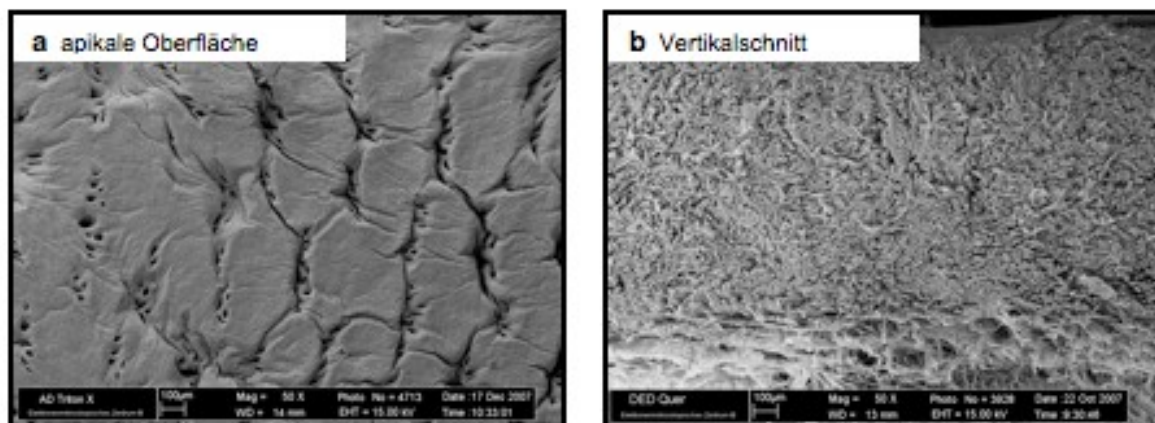


Abb. 10 REM des azellulären, dermalen Allo-Tx, Originalvergrößerung: 500×.

5.2 Charakterisierung der Grenzflächenreaktion zwischen azellulärem, dermalen Allo-Tx und umliegendem Bindegewebe

5.2.1 Das Cytokinmilieu

5.2.1.1 Qualitative Resultate

TGF-beta1 zeigt einen kombinierten extra- und intrazellulären Färbetyp. Das Cytokin weist sowohl an Tag 7 (Abb. 11a) als auch an Tag 14 (Abb. 11b) p. op. eine homogene Verteilung im periimplantären Bindegewebe auf.

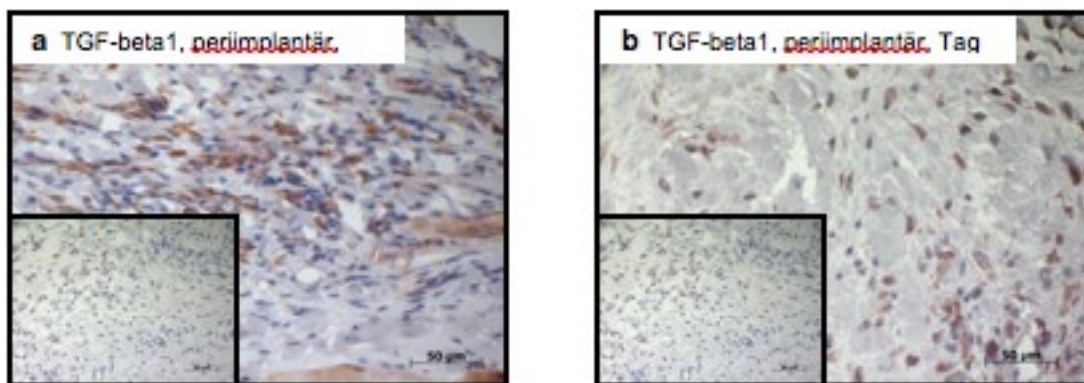


Abb.11 TGF-beta1-Expression nach Implantation der ADMs, Originalvergrößerung: 400×, Negativkontrolle: unten links.

Auch VEGF zeigt einen kombiniert extra- und intrazellulären Färbetyp, wobei sich positive Zellen an Tag 7 (Abb. 12a) und Tag 14 (Abb. 12b) über den gesamten periimplantären Bereich verteilen.

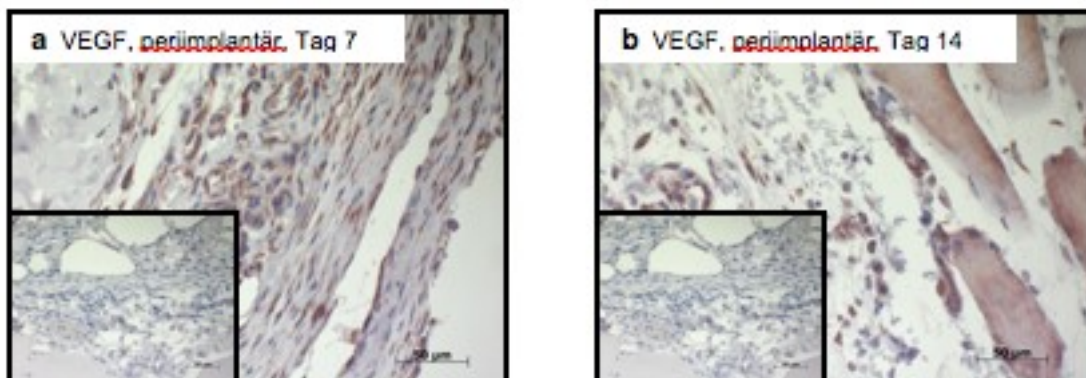


Abb.12 VEGF-Expression nach Implantation einer ADM, Originalvergrößerung: 400×, Negativkontrolle: unten links.

5.2.1.2 Quantitative Resultate

TGF-beta1 zeigt an Tag 7 nach Implantation azellulärer, dermaler Allo-Tx im umliegenden Bindegewebe eine verglichen mit dem Implantationszeitpunkt (Tag 0) suprabasale Expression. An Tag 14 p.op. hat die TGF-beta1-Expression deutlich abgenommen. Sie liegt jedoch immer noch über dem Basalniveau des Gewebes. Die periimplantäre VEGF-Expression zeigt am 7. Tag nach Implantation eines azellulären, dermalen Allo-Tx basales Niveau. Zwischen 7. und 14. Tag kommt es zu einer deutlichen Senkung des Gewebe-VEGF-Spiegels unter den Ruhewert (Abb. 13).

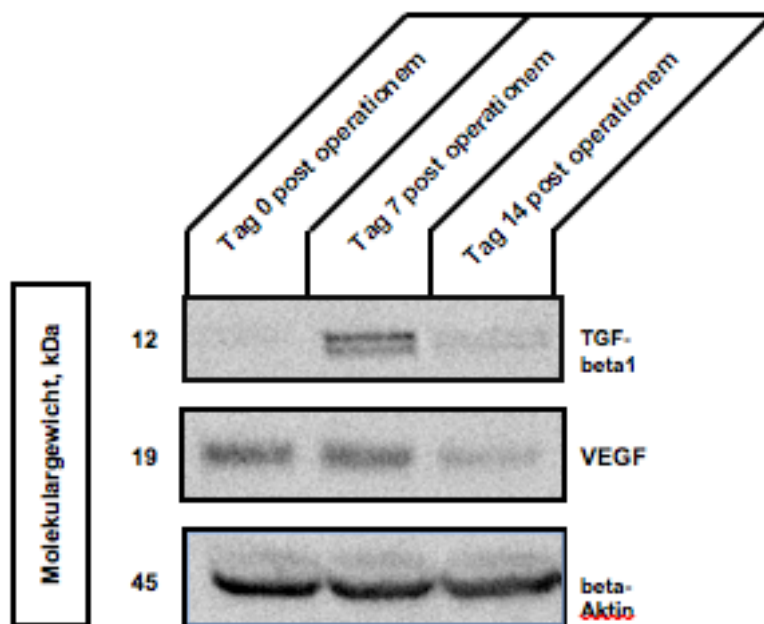


Abb.13 Western-Blot zur Quantifizierung der TGF-beta1- und VEGF-Expression im Heilungsbereich. Die normalisierte Protein-Ratio zeigt gleiche Expression für beta-Aktin und damit gleiche Gesamtproteinmenge. Eine quantitative Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist somit gewährleistet.

Vor Transplantation eines azellulären, dermalen Allo-Tx exprimieren 5.000% (SA: 0.024) der Zellen der Haut TGF-beta1. Der Anteil exprimierender Zellen steigt durch Implantation signifikant ($p=0.000$) auf 41.998% (SA: 0.026) an. Zwischen 7. und 14. p.op. Tag ist ein signifikanter Abfall ($p=0.000$) der TGF-beta1-Expression auf 15.000% (SA: 0.024) detektierbar.

Im subdermalen Bindegewebe gesunder Haut exprimieren 25.000% (SA: 0.024) der Zellen VEGF. Bereits 7 Tage nach Transplantation eines azellulären, dermalen Allo-Tx kommt es zu einer signifikanten ($p=0.000$) Expressionsminderung auf 20.000% (SA: 0.023). Diese zeigt

bis zum 14. p.op. Tag Progredienz. Die Expressionsminderung zwischen 7. und 14. Tag auf 10.000% (SA: 0.025) ist erneut signifikant ($p=0.000$), (Abb. 14).

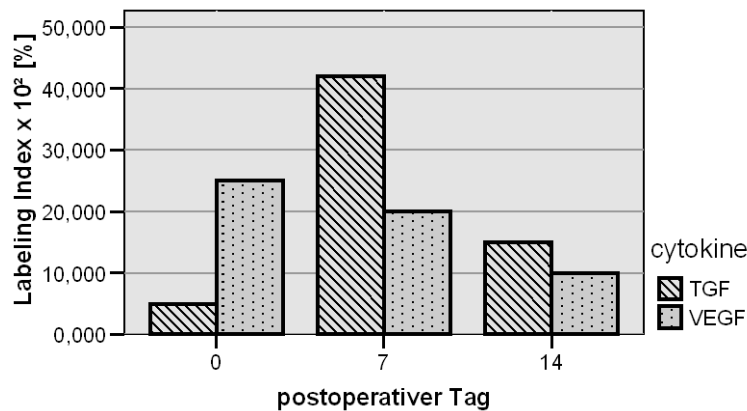


Abb. 14 Bar-Plot zur Darstellung der VEGF-sowie TGF-beta1-Expression periimplantär mittels Labeling-Index über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen den Mittelwerten.

5.2.2 Die Gewebereorganisation

5.2.2.1 Qualitative Resultate

Am 7. p. op. Tag ist ein deutlicher fibrokontraktiler Umbau des periimplantären Bindegewebes detektierbar. In der HE-Übersichtsfärbung zeigt sich die Formierung einer, die Tx eingrenzenden, Gewebehülle (Abb. 15a). Diese verdickt sich zwischen 7. und 14. p.op. Tag deutlich (Abb. 15b).

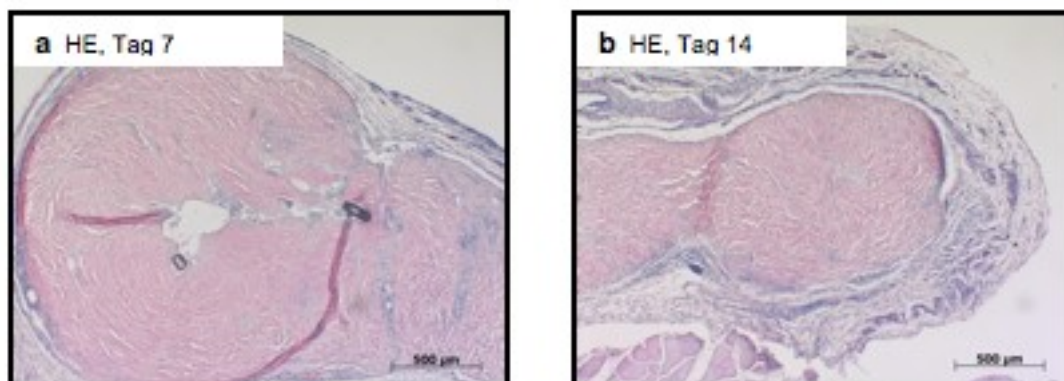


Abb. 15 Fibrokontraktiler Gewebeumbau im Einheilungsbereich, Originalvergrößerung: 50×.

Diese Hülle lässt sich immunhistochemisch als myofibroblastenreiches Bindegewebe charakterisieren. Die Myofibroblasten zeigen typische, elongierte Spindelform. Sie verteilen sich homogen über das periimplantäre Bindegewebe (Abb. 16a, b).

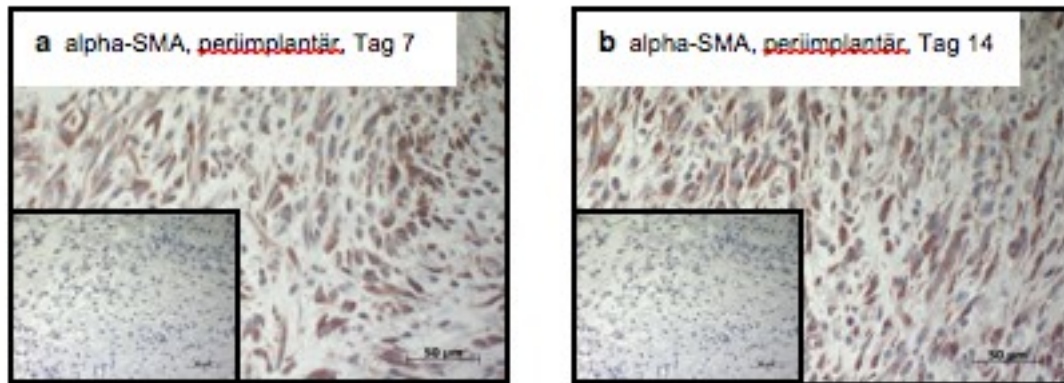


Abb. 16 Alpha-SMA-Expression im Einheilungsbereich, Originalvergrößerung: 400×, Negativkontrolle: unten links.

Die detektierbaren Gefäße besitzen verschiedene Kaliber. Viele Gefäße sind nicht nur strukturell nachweisbar sondern zeigen Funktionalität, die durch das Vorhandensein von Erythrozyten im Lumen bewiesen werden kann. Eine besonders hohe Gefäßdichte weist das basal an das Tx grenzende, dem M. gracilis anliegende, Bindegewebe auf (Abb. 17a, b).

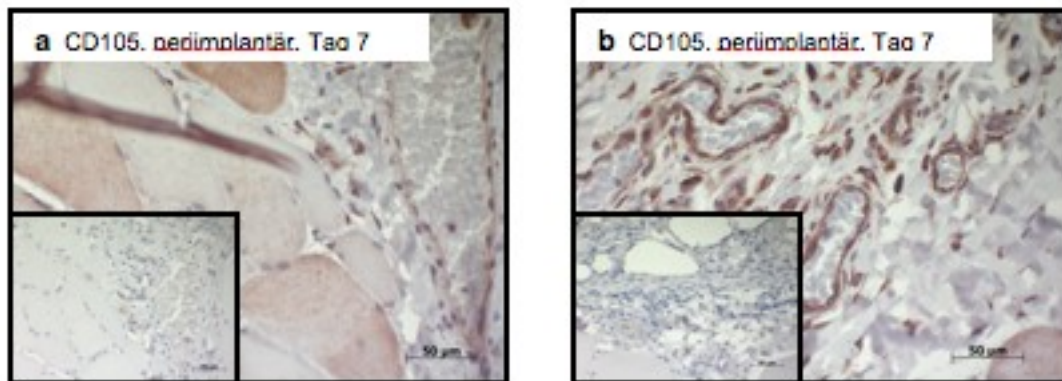


Abb. 17 Blutgefäße im Einheilungsbereich, Originalvergrößerung: 400×, Negativkontrolle: unten links.

5.2.2.2 Quantitative Resultate

Die basale alpha-SMA-Expression in gesundem, subdermalen Bindegewebe liegt bei 12.765% (SA: 6.249), wobei lediglich mit Gefäßen assoziierte Zellen positiv exprimieren. Durch Transplantation azellulärer, dermaler Allo-Tx wird im umliegenden Bindegewebe die alpha-SMA-Expression signifikant ($p=0.000$) induziert und erreicht einen Wert von 76.930% (SA: 6.256). Zwischen dem 7. und 14. Tag nach Transplantation kommt es zu keinem signifikanten ($p=0.167$) Anstieg der alpha-SMA-Expression. Am 14. p. op. Tag exprimieren 80.366% (SA: 6.229) der Zellen alpha - SMA (Abb. 18).

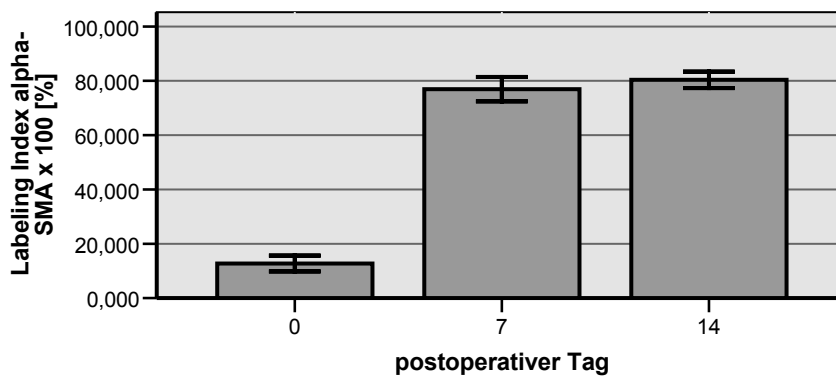


Abb. 18 Bar-Plot zur Darstellung des alpha-SMA-Labeling Index im Heilungsbereich über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

Die Gesamtzahl der Gefäße im umliegenden Bindegewebe bleibt über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant bei 7.000 (SA: 1.813) (Die Ergebnisse wurden nicht graphisch ausgewertet.).

Vor Implantation der azellulären, dermalen Allo-Tx liegt die Gesamtlumenfläche der Gefäße der Haut bei 2392.121 μm^2 (SA: 94.964). Zwischen Implantation und 7. p. op. Tag nimmt die Lumenfläche der periimplantären Kapillaren auf 2334.242 μm^2 (SA: 98.340) ab. Die Verminderung ist jedoch nicht signifikant ($p=0.520$). Zwischen 7. und 14. p. op. Tag besteht im periimplantären Bindegewebe eine signifikante ($p=0.028$) Regression der Lumenfläche der Kapillaren. Am 14. Tag nach Implantation beträgt die Gesamtlumenfläche periimplantärer Kapillaren 2100.431 μm^2 (SA: 95.340); (Abb. 19).

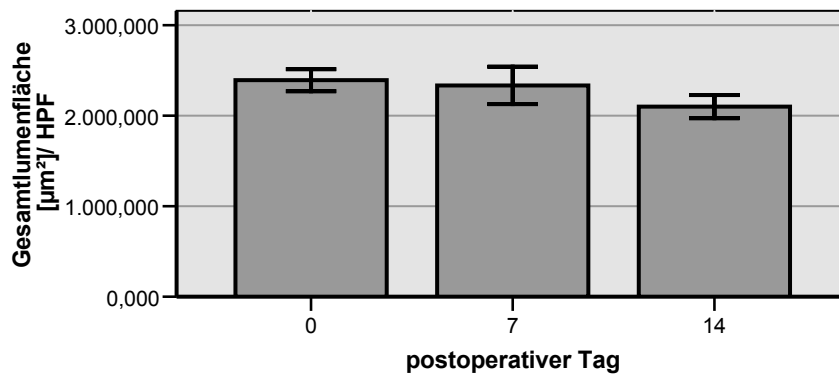


Abb. 19 Bar-Plot zur Darstellung der Gesamtlumenfläche der Gefäße im Heilungsbereich über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

In gesunder Rattenhaut beträgt der Anteil der Gesamtlumenfläche an der Gesamtgesichtsfeldfläche 2.691% (SA: 0.109). Zwischen Implantation und 7. p.op. Tag wird er auf 2.621% (SA: 0.115) nicht signifikant ($p = 0.066$) vermindert. Zwischen Tag 7 und 14 nimmt der Anteil der Lumenfläche an der Gesamtgesichtsfeldfläche signifikant ($p=0.029$) ab. An Tag 14 beträgt er 2.362% (SA: 0.108), (Abb. 20).

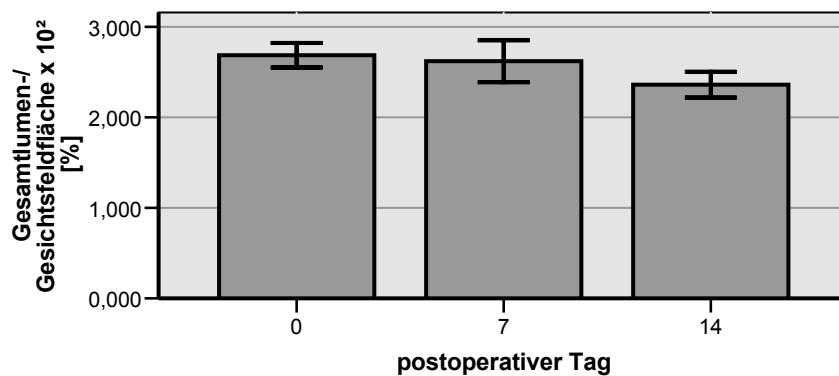


Abb. 20 Bar-Plot zur Darstellung des Anteils der Gesamtlumenfläche der Gefäße im Heilungsbereich an der Gesamtgesichtsfeldfläche bei 400× Originalvergrößerung über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

5.2.3 Die Korrelation

Im Zeitraum zwischen Implantation des azellulären, dermalen Allo-Tx und 7. Untersuchungstag besteht eine starke, positive Korrelation ($r_p=0.996$) zwischen TGF-beta1- und alpha-SMA-Expression. Ein Anstieg in der TGF-beta1-Expression tritt zeitgleich mit einer Steigerung der alpha-SMA-Expression auf (Abb.21).

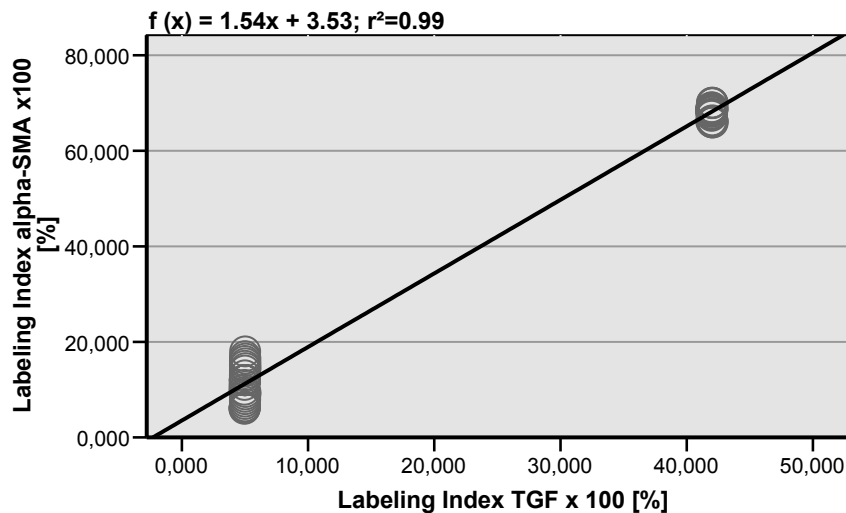


Abb. 21 Korrelation zwischen alpha-SMA- und TGF-beta1.Expression im Heilungsbereich zwischen Implantation und 7. p.op. Tag.

Zwischen 7. und 14.Untersuchungstag korrelieren TGF-beta1- und alpha-SMA stark negativ miteinander ($r_p= -0.958$), wobei ein Abfall des TGF-beta1-Gewebespiegels parallel zu einer Steigerung der alpha-SMA-Expression auftritt (Abb. 22).

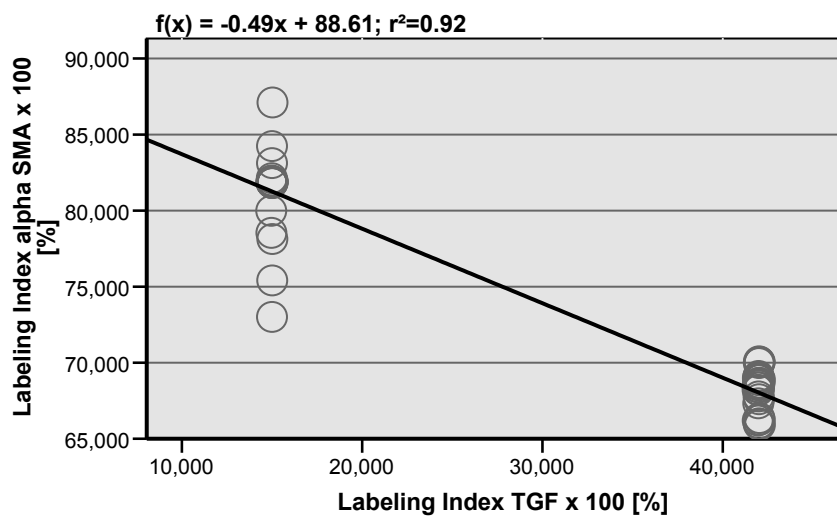


Abb. 22 Korrelation zwischen alpha-SMA- und TGF-beta1.Expression im Heilungsbereich zwischen 7. und 14. p.op. Tag.

Zwischen dem TGF-beta1-Gehalt des Gewebes und dem Anteil der Fläche von Gefäßlumina an der Gesamtgesichtsfeldfläche besteht zwischen Implantation und 7. p.op. Tag eine schwach-negative Korrelation ($r_P = -0.252$). Eine Abnahme der Fläche der Gefäßlumina tritt zeitgleich mit einer TGF-beta1-Expressions-Steigerung auf (Abb.23).

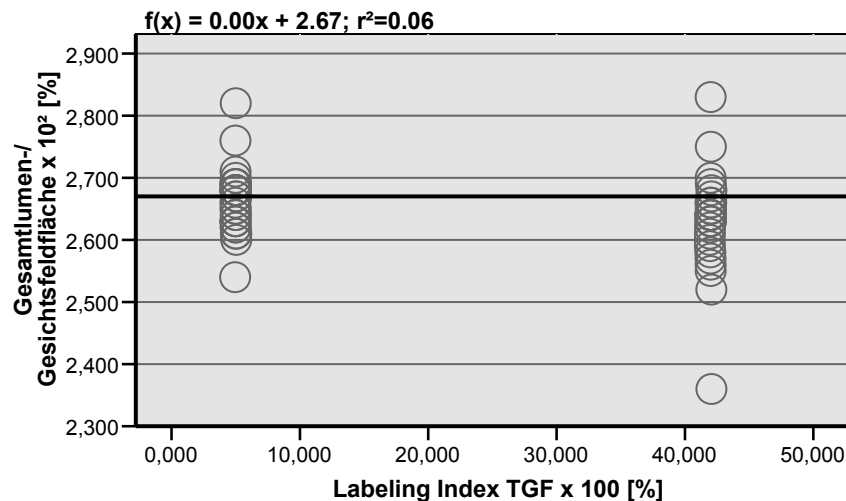


Abb. 23 Korrelation zwischen Perfusion des Heilungsbereiches und TGF-beta1-Expression zwischen Implantation und 7. p.op. Tag.

Von Tag 7 bis 14 p.op. besteht eine stark-positive Korrelation ($r_P = 0.886$) zwischen dem Gewebe-TGF-beta1 und der Lumenfläche. Folglich sinkt zeitgleich zum TGF-beta1-Spiegel auch die Fläche der Gefäßlumina (Abb. 24).

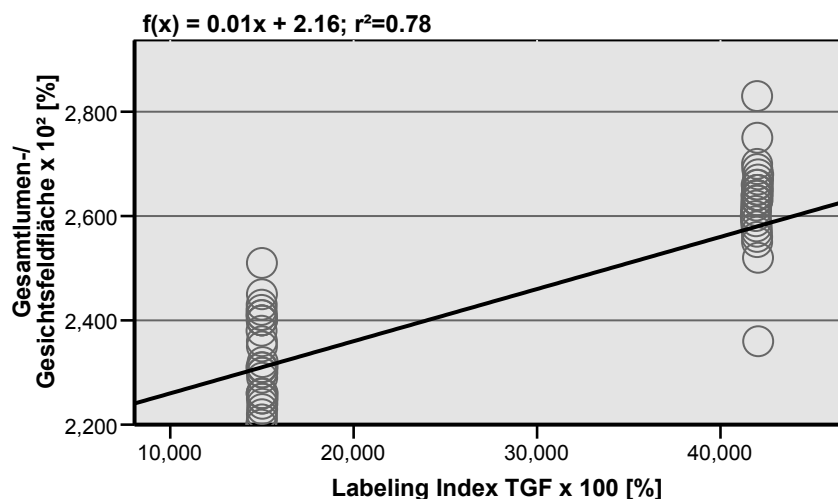


Abb. 24 Korrelation zwischen Perfusion des Heilungsbereiches und TGF-beta1-Expression zwischen 7 und 14. p.op. Tag.

Die VEGF-Expression der Gewebe und der Anteil der Fläche der Gefäßlumina an der Gesamtgesichtsfeldfläche korrelieren zwischen der Implantation und dem 7. p.op. Tag schwach-positiv miteinander ($r_P = 0.250$). Eine Minderung der VEGF-Expression tritt zeitgleich mit einer Verminderung der Fläche der Gefäß-Lumina auf (Abb. 25).

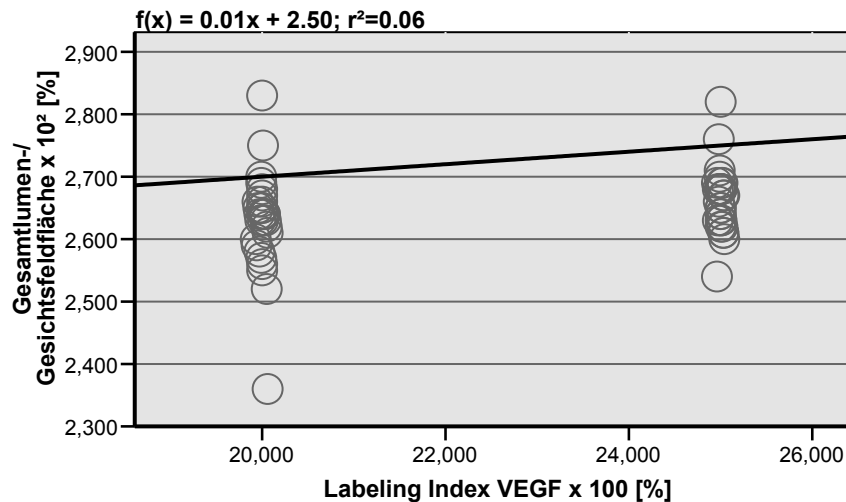


Abb. 25 Korrelation zwischen Perfusion des Heilungsbereiches und VEGF-Expression zwischen Implantation und 7. p.op. Tag.

Zwischen 7. und 14. p.op. Tag besteht eine stark-positive Korrelation ($r_P = 0.885$) zwischen VEGF-Expression und Fläche der Lumina. Folglich nimmt zeitgleich mit der VEGF-Expression auch die Fläche der Gefäßlumina ab (Abb. 26).

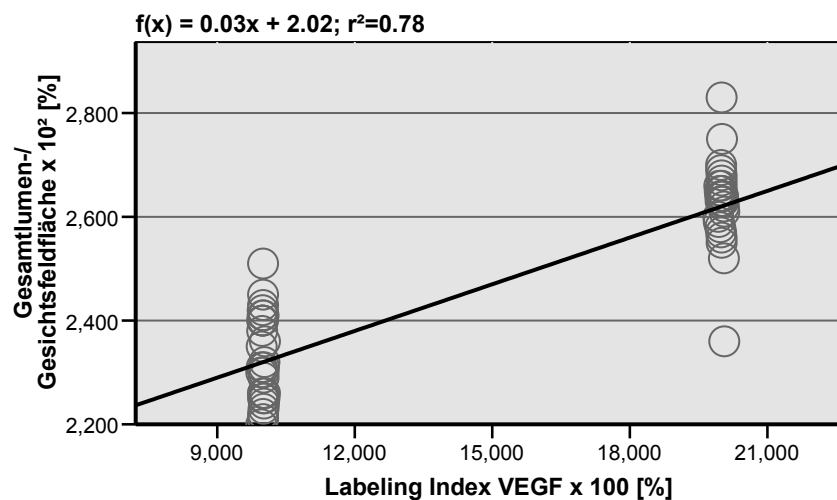


Abb. 26 Korrelation zwischen Perfusion des Heilungsbereiches und VEGF-Expression zwischen 7. und 14. p.op. Tag.

5.2.4 Die Neovaskularisation des Allo-Tx

5.2.4.1 Qualitative Resultate

Im Bereich der azellulären, dermalen Allo-Tx sind positiv gefärbte Einzelzellen und Cluster aus bis zu 6 Zellen detektierbar. Diese liegen unabhängig und ohne Assoziation zu den, in der Matrix befindlichen, azellularisierten Gefäßkanälen besonders in den Randbereichen der Implantate in hoher Dichte. Die Wände der azellularisierten Gefäßkanäle zeigen Besiedlung durch CD105-positive Zellen (Abb. 27a). Zusätzlich treten, in Gruppen gelegene, kapillarartige Strukturen mit zentralem Lumen, ohne Assoziation zu den azellulären Gefäßkanälen der Matrix auf. Derartige Gebilde sind nicht nur strukturell nachweisbar, sondern auch funktionell, was durch die Präsenz von Erythrozyten im Lumen belegt wird (Abb. 27b).

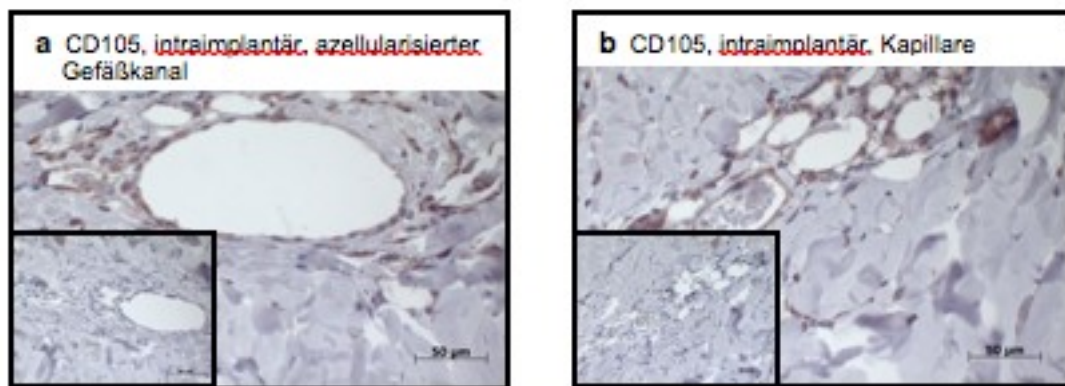


Abb. 27 Blutgefäße innerhalb der ADMs p.op., Originalvergrößerung: 400×;
Negativkontrolle: unten links.

5.2.4.2 Quantitative Resultate

Die Zahl intraimplantärer Kapillaren beträgt 6.337 (SA: 1.751) an Tag 7 p.op.. Zwischen Tag 7 und 14. p.op. ist eine nicht signifikante ($p=0.604$) Elevation auf 6.835 (SA: 1.754) detektierbar (Abb. 28).

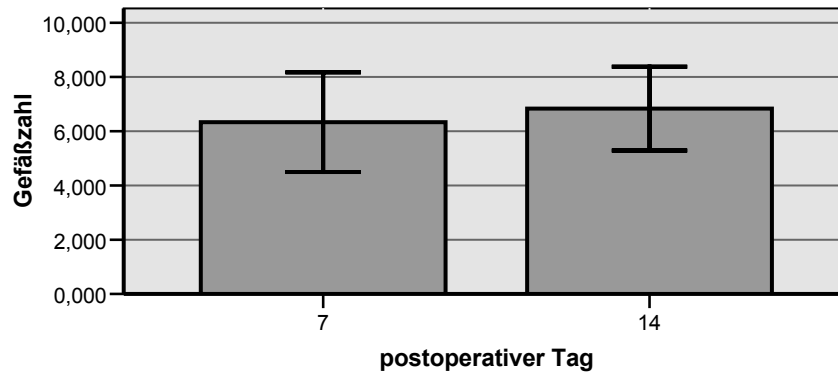


Abb. 28 Bar-Plot zur Darstellung der Zahl der Gefäße pro Gesichtsfeld innerhalb der ADMs bei 400x Originalvergrößerung über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

Die Gesamtfläche intraimplantärer Gefäße beträgt an Tag sieben 906.701 μm^2 (SA: 458.463) und nimmt bis zu Tag 14 signifikant ($p=0.048$) auf 2580.192 μm^2 (SA: 458.469) zu (Abb. 29).

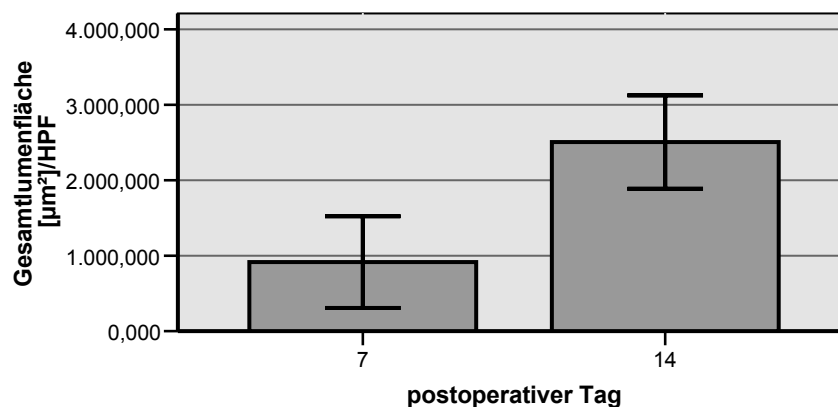


Abb. 29 Bar-Plot zur Darstellung der Gesamtlumenfläche der Gefäße pro Gesichtsfeld innerhalb der ADMs bei 400x Originalvergrößerung über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

Zwischen 7. und 14. p.op. Tag nach Implantation eines azellulären, dermalen Allo-Tx kommt es weiterhin zu einer signifikanten ($p=0.048$) Zunahme des Anteils der Gefäßfläche an der

Gesamtgesichtsfeldfläche von 1.020% (SA: 0.515) an Tag 7 auf 2.901% (SA: 0.518) an Tag 14 (Abb. 30).

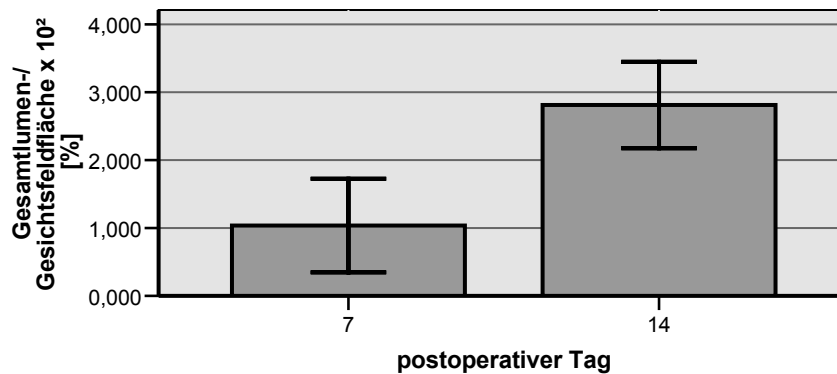


Abb. 30 Bar-Plot zur Darstellung des Anteils der Gesamtlumenfläche der Gefäße innerhalb der ADMs an der Gesamtgesichtsfeldfläche bei 400× Originalvergrößerung über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

Das Perfusionsverhältnis des azellulären, dermalen Allo-Tx korreliert mittelmäßig stark negativ ($r_P = -0.612$) mit dem Perfusionsverhältnis des umliegenden Gewebe. Folglich nimmt der Anteil der Gefäßlumenfläche an der Gesamtgesichtsfeldfläche über den Untersuchungszeitraum periimplantär ab während er intraimplantär zunimmt (Abb. 31).

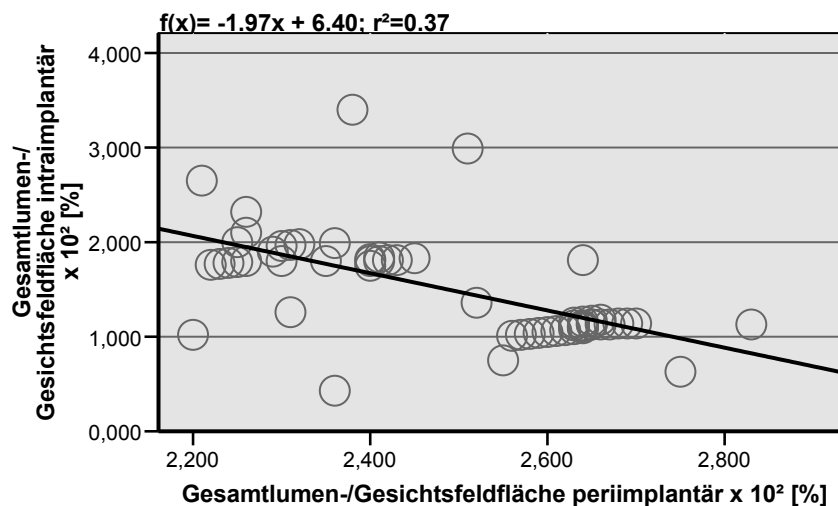


Abb. 31 Korrelation zwischen intra-und periimplantärer Perfusion zwischen 7. und 14. p.op. Tag.

5.3 Nukleofektion - Eine effiziente Methode zur transienten Transfektion von Fibroblasten aus der oralen Mukosa der Ratte?

5.3.1 Transfektionseffizienz

Bei Anwendung des „Basic Nucleofector Kits“ exprimieren bei Applikation von Programm U23 54.672% (SA: 0.577) und bei Programm P-22 63.331% (SA: 1.528) der Fibroblasten der oralen Mukosa der Ratte das GFP-Transgen 24h nach Nukleofektion. Das „Dermal Fibroblast Kit“ ist wesentlich uneffizienter. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion exprimieren bei Anwendung von Programm U23 nur 57.331% (SA: 1.528) und bei Programm P-22 57.000% (SA: 0.000) der Fibroblasten das Transgen (Abb. 32).

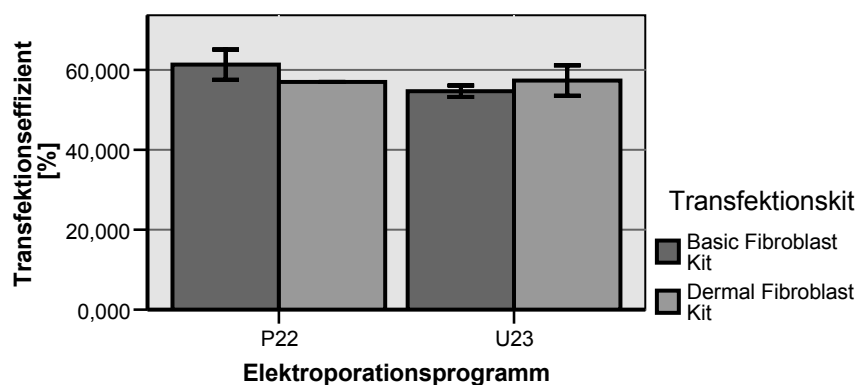


Abb. 32 Effizienz der GFP-Transgenexpression 24h post nucleofectionem bei Applikation verschiedener Transfektionskits und Elektroporationsprogramme.

5.3.2 Transfektionspersistenz

Vierundzwanzig Stunden post nucleofectionem exprimieren 63.331% (SA: 1.528) der transfizierten Zellen das GFP-Transgen. Die Transgen-Expression nimmt zwischen 1. und 2. Tag post nucleofectionem signifikant ($p=0.000$) auf 74.330% (SA: 1.528) zu. Auf diese Expressionssteigerung folgt eine signifikante ($p=0.000$) Reduktion auf 50.671% (SA: 1.528) an Tag 3. Zwischen Tag 3 und 4 nimmt die Transgen-Expression weiterhin signifikant ($p=0.003$) auf 41.000% (SA: 1.523) ab. Auf diese Abnahme folgt eine weitere signifikante ($p=0.000$) Reduktion der Transgen-Expression auf 22.000% (SA: 1.523) zwischen Tag 4 und

7. Von Tag 7 zu Tag 9 post nucleofektionem fällt die Transgen-Expression noch einmal signifikant ($p=0.003$) ab. Sie erreicht an Tag 9 einen Wert von 14.000% (SA:1.526), (Abb. 33).

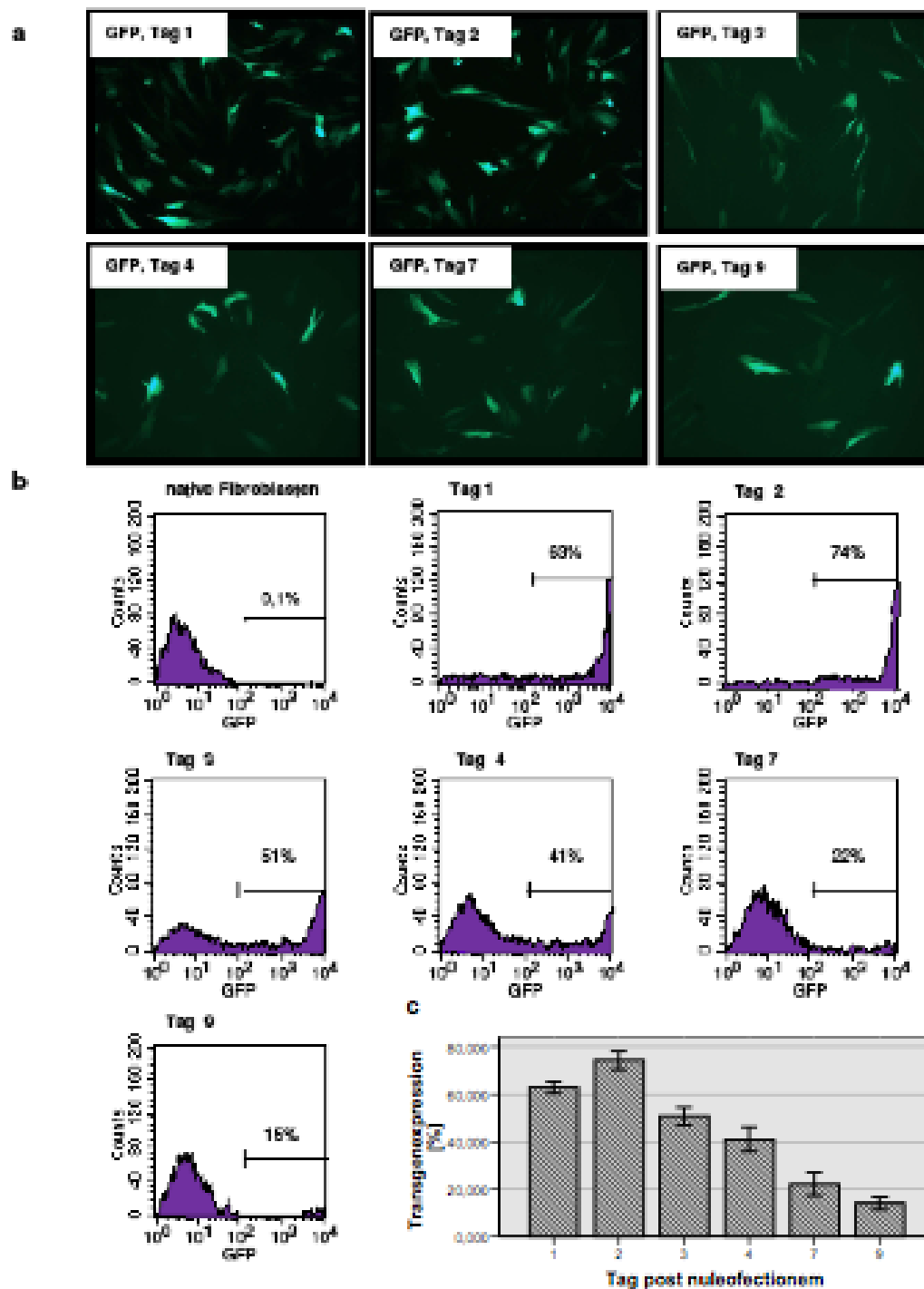


Abb. 33 Persistenz der GFP-Transgenexpression bei Anwendung des „Basic Fibroblast Kit“ und des Programmes P22. (a) Fluoreszenzmikroskopie, Originalvergrößerung: 100 \times , (b) FACS-Resultate, (c) Bar-Plot zur Darstellung der Transgenexpression über die Zeit; Balken repräsentieren Mittelwerte, Error-Bars die Standardabweichung.

5.4 Therapeutische Angiogenese durch ex-vivo Gentherapie

5.4.1 Qualitative Resultate

Weder durch Co-Tx autologer, nativer noch VEGF-transgener Fibroblasten ergeben sich qualitative Unterschiede in der intra-sowie periimplantären Kapillararchitektur über die Zeit bei s.c. Einheilung eines azellulären, dermalen Allo-Tx verglichen mit der Gruppe ohne Zellinjektion.

5.4.2 Quantitative Resultate

5.4.2.1 Das VEGF-Profil

Sieben Tage nach Implantation azellulärer, dermalen Allo-Tx in s.c. Taschen der Leistenregion der Ratten ist in allen Gruppen eine basale VEGF-Expression detektierbar. In Gruppe 1 fällt die VEGF-Expression am 14. Tag im Heilungsbereich auf ein subbasales Level. Injektion nativer, autologer Fibroblasten in den Heilungsbereich hat keinen Einfluss auf das VEGF-Expressions-Profil. Im Gegensatz dazu ist nach Applikation von VEGF-transgenen, autologen Fibroblasten auch am 14. Tag ein konstanter, basaler VEGF-Spiegel detektierbar (Abb. 34).

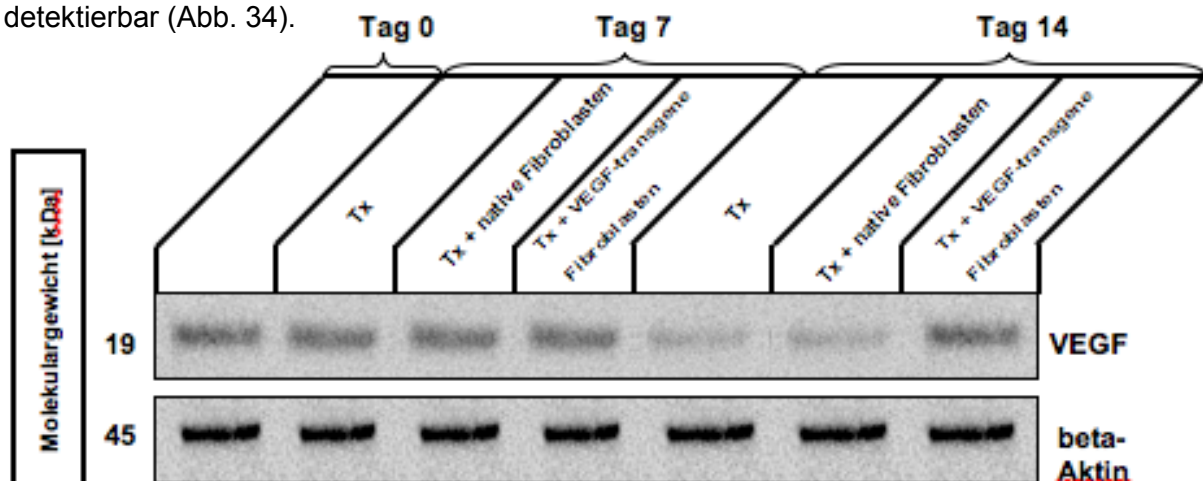


Abb. 34 Western-Blot zur Quantifizierung der VEGF-Expression im Heilungsbereich. Die normalisierte Protein-Ratio zeigt gleiche Expression für beta-Aktin und damit gleiche Gesamtproteinmenge. Eine quantitative Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist somit gewährleistet.

Vor Implantation der azellulären, dermalen Allo-Tx exprimieren in der gesunden Haut aller Tiere 25.000% (SA: 0.024) der Zellen VEGF. Nach Tx kommt es am 7. p.op. Tag zu einer signifikanten ($p=0.000$) Expressionsminderung. Der Anteil VEGF-positiver Zellen beträgt nun nur noch 20.000% (SA: 0.023). Injektion nativer, autologer Fibroblasten hat keinen Einfluss auf die VEGF-Expression im Heilungsbereich. Auch in Gruppe 2 beträgt der Anteil positiver Zellen an Tag 7 nur noch 19.998% (SA: 0.024). Auch nach Tx VEGF-transgener Fibroblasten ist eine signifikante ($p=0.000$) Abnahme der Expression auf 23.002% (SA: 0.023) vom Tag der Implantation bis zum 7. p.op. Tag nachweisbar. Trotzdem ist am 7. Tag der Anteil VEGF-positiver Zellen im Heilungsbereich nach Co-Tx der transgenen Zellen signifikant ($p=0.000$) höher als nach singulärer Allo-Tx beziehungsweise Co-Tx von nativen Fibroblasten. Zwischen 7. und 14. p.op. Tag kommt es in allen Gruppen zu einer signifikanten VEGF-Expressionsminderung. Bei singulärer Allo-Tx nimmt der Anteil der positiven Zellen signifikant ($p=0.000$) auf 10.000% (SA:0.025) ab. Allo-Tx und Co-Tx autologer, nativer Fibroblasten führt zu einer signifikanten ($p=0.000$) Expressionsminderung auf 10.002% (SA: 0.040) an Tag 14. Auch nach Allo-Tx und Co-Tx VEGF-transgener, autologer Fibroblasten nimmt der Anteil VEGF-exprimierender Zellen signifikant ($p=0.000$) auf 20.005% (SA: 0.038) ab. Der Anteil positiver Zellen im Heilungsbereich ist dennoch auch an Tag 14 nach Co-Tx VEGF-transgener Zellen signifikant ($p=0.000$) größer als in den anderen beiden Gruppen (Abb. 35).

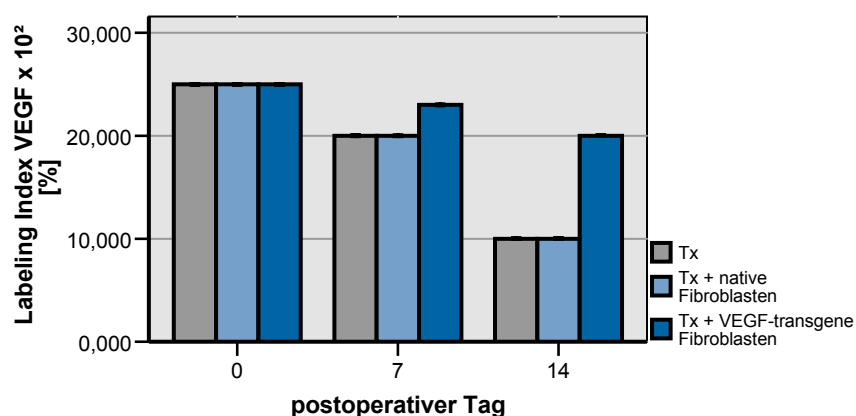


Abb. 35 Bar-Plot zur Darstellung der VEGF-Expression periimplantär mittels Labeling-Index über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen den Mittelwerten.

5.4.2.2 Die periimplantäre Gefäßsituation

Die Gesamtzahl der Gefäße im umliegenden Bindegewebe bleibt über den gesamten Untersuchungszeitraum unabhängig von der Gruppe konstant bei 7.000 (SA: 1.813) (Die Ergebnisse wurden nicht graphisch ausgewertet.).

Vor Implantation der azelluläre, dermalen Allo-Tx liegt die Gesamtlumenfläche bei den Tieren der 3 Versuchsgruppen bei 2392.121 μm^2 (SA: 94.964). Zwischen Implantation und 7. p. op. Tag nimmt die Lumenfläche der periimplantären Kapillaren nach Allo-Tx auf 2334.242 μm^2 (SA: 98.340) ab. Diese Verminderung ist jedoch nicht signifikant ($p=0.520$). Weder Co-Tx autologer noch VEGF-transgener Fibroblasten haben Einfluss auf die Gesamtlumenfläche zwischen Implantation und Tag 7. Zwischen 7. und 14. p. op. Tag besteht im periimplantären Bindegewebe nach Implantation der azellulären, dermalen Allo-Tx eine Regression der Lumenfläche der Kapillaren ($p=0.028$). Die Gesamtlumenfläche beträgt an Tag vierzehn 2100.431 μm^2 (SA: 95.340). Auch in Gruppe 2 ist zwischen 7. und 14. p.op. Tag eine signifikante ($p=0.008$) Regression detektierbar. Die Lumenfläche beträgt an Tag 14 2080.122 μm^2 (SA: 99.158). Nach Co-Tx VEGF-transgener Fibroblasten ist im Gegensatz dazu keine ($p=0.094$) Regression der Lumenfläche zu verzeichnen. Am 14. p.op. Tag beträgt sie 2200.000 μm^2 (SA: 97.527), (Abb. 36).

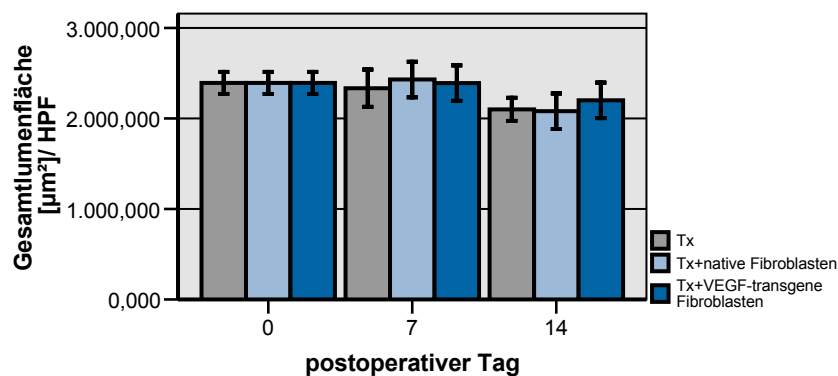


Abb. 36 Bar-Plot zur Darstellung der Gesamtlumenfläche der Gefäße im Heilungsbereich über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

Vor Implantation beträgt der Anteil der Gesamtlumenfläche an der Gesamtgesichtsfeldfläche 2.691% (SA: 0.109). Nach Implantation azellulärer, dermaler Allo-Tx wird der Anteil bis zum 7. p.op. Tag auf 2.621% (SA: 0.115) nicht signifikant ($p = 0.066$) vermindert. Weder Co-Tx autologer noch VEGF-transgener Fibroblasten haben Einfluss auf den Anteil der Gesamtlumen- an der Gesamtgesichtsfeldfläche. Zwischen 7. und 14. p. op. Tag besteht im periimplantären Bindegewebe nach Implantation der azellulären, dermalen Allo-Tx eine signifikante Regression des Anteils der Lumenfläche an der Gesamtgesichtsfeldfläche ($p=0.029$). Der Anteil beträgt an Tag vierzehn 2.362% (SA: 0.108). Co-Tx nativer Fibroblasten hat keinen Einfluss auf die Regression. Auch in Gruppe 2 ist zwischen 7. und 14. p.op. Tag eine signifikante ($p=0.008$) Regression detektierbar. Der Anteil beträgt an Tag 14 2.338% (SD: 0.177). Nach Co-Tx VEGF-transgener Fibroblasten ist im Gegensatz dazu keine Regression der Perfusion zu verzeichnen. Am 14. p.op. Tag beträgt der Anteil der Gesamtfläche der Gefäßlumina an der Gesamtgesichtsfeldfläche 2.418% (SA: 0.169), (Abb. 37).

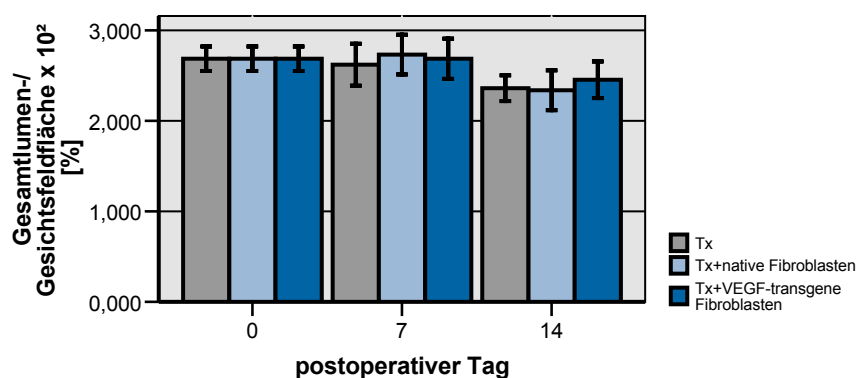


Abb. 37 Bar-Plot zur Darstellung des Anteils der Gesamtlumenfläche der Gefäße im Heilungsbereich an der Gesamtgesichtsfeldfläche bei 400× Originalvergrößerung über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

5.4.2.3 Die Korrelation

Für alle Gruppen besteht über den gesamten Untersuchungszeitraum eine starke bis mittlere, positive Korrelation zwischen der Anzahl VEGF-exprimierender Zellen und dem Anteil der Gefäßlumenfläche an der Gesamtgesichtsfeldfläche im Heilungsbereich (Gruppe 1: $r = 0,73$; Gruppe 2: $r = 0,71$; Gruppe 3: $r = 0,54$), (Abb. 38).

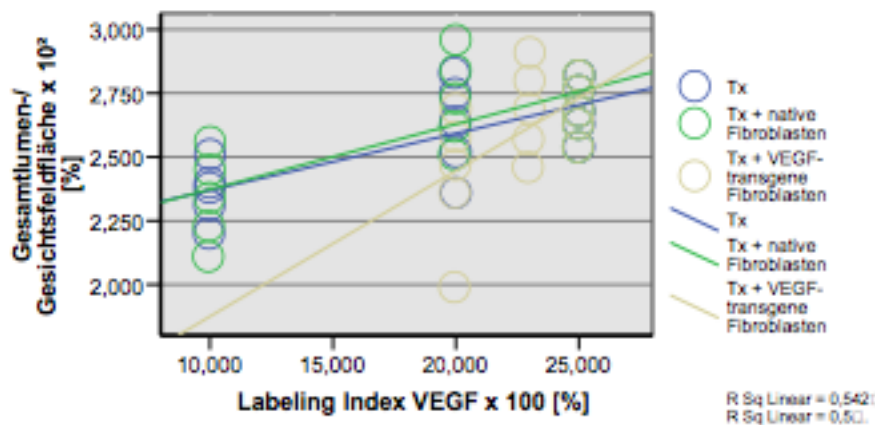


Abb. 38 Korrelation zwischen Perfusion des Heilungsbereiches und VEGF-Expression über den gesamten Untersuchungszeitraum. grüne Gerade: $(0,03x + 2,12, r^2=0,50)$; blaue Gerade: $(0,02x + 2,15, r^2=0,54)$; beige Gerade: $(0,06x + 1,30, r^2=0,29)$.

5.4.2.4 Die Neovaskularisation des Allo-Tx

Am 7. Tag nach Implantation beträgt die intraimplantäre Kapillarzahl 6.337 (SA: 1.751) in Gruppe 1, 6.832 (SA: 1.472) in Gruppe 2 und 8.674 (SA: 1.862) in Gruppe 3. Während Co-Tx nativer Fibroblasten keinen signifikanten ($p=0.604$) Einfluss auf die Tx-Perfusion an Tag 7 hat, bedingt VEGF-Transfektion eine signifikante ($p=0.049$) Erhöhung der Kapillarzahl. Vierzehn Tage nach OP beträgt die Kapillarzahl in 6.835 (SA: 1.751) in Gruppe 1, 7.009 (SA: 1.672) in Gruppe 2 und 8.501 (SA: 1.562) in Gruppe 3. Implantation VEGF-transgener Fibroblasten bedingt eine signifikante ($p=0.049$) Hypervaskularisation an Tag 14 (Abb. 39).

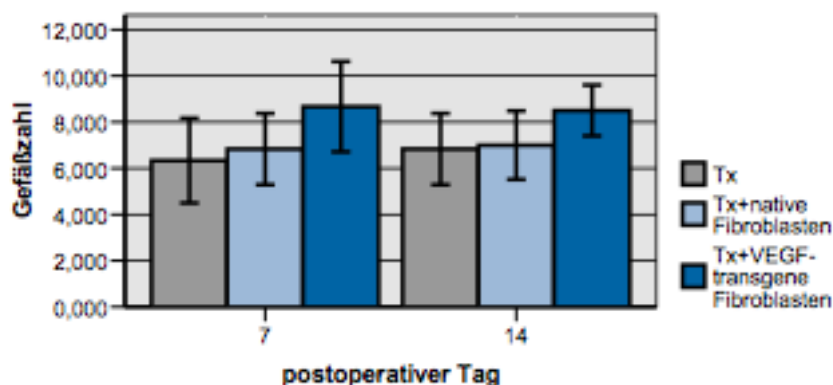


Abb. 39 Bar-Plot zur Darstellung der Zahl der Gefäße pro Gesichtsfeld innerhalb der ADMs bei 400× Originalvergrößerung über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

Am 7. p.op. Tag beträgt die Gesamtfläche intrainplantärer Gefäßlumina 906.701 μm^2 (SA:458.463) in Gruppe 1, 1240.011 μm^2 (SA: 829.120) in Gruppe 2 und 1817.512 μm^2 (SA:858.231) in Gruppe 3. Tx autologer, nativer Fibroblasten hat keinen ($p = 0.409$), Tx VEGF–transgener Fibroblasten einen signifikanten ($p = 0.045$) Einfluss auf die Lumenfläche an Tag 7.

Zwischen 7. und 14. p.op. Tag nimmt die Lumenfläche in allen 3 Gruppen signifikant ($p=0.001$) zu.

14 Tage p.op. beträgt die Gesamtfläche intrainplantärer Gefäßlumina 2580.192 μm^2 (SA: 458.469) in Gruppe 1, 2913.121 μm^2 (SA: 1450.109) in Gruppe 2 und 4547.121 μm^2 (SA: 1034.431) in Gruppe 3. Tx autologer, nativer Fibroblasten hat keinen ($p = 0.728$), Tx VEGF–transgener Fibroblasten einen signifikanten ($p=0.040$) Einfluss auf die Lumenfläche an Tag 14.

Co–Tx VEGF–transgener, autologer Fibroblasten hat über den gesamten Untersuchungszeitraum einen signifikanten ($p=0.028$) Einfluss auf die Lumenfläche (Abb.40).

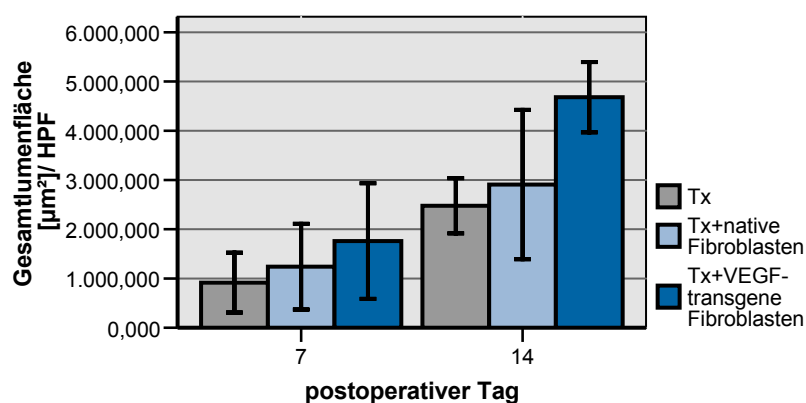


Abb. 40 Bar-Plot zur Darstellung der der Gesamtflächen der Gefäße pro Gesichtsfeld innerhalb der ADMs bei 400× Originalvergrößerung über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

Der Anteil der Lumenfläche an der Gesamtgesichtsfeldfläche innerhalb des Tx-Gewebes beträgt an Tag 7 p.op 1.020% (SA: 0.515) in Gruppe 1, 1.391% (SA: 0.931) in Gruppe 2 und 2.101% (SA: 0.986) in Gruppe 3. Tx autologer, nativer Fibroblasten hat keinen ($p = 0.408$), Tx VEGF–transgener Fibroblasten einen signifikanten ($p = 0.040$) Einfluss auf die Lumenfläche an Tag 7.

Vom 7. zum 14. p.op. Tag kommt es in allen 3 Gruppen zu einer signifikanten ($p=0.001$) Zunahme des Anteils der Lumenfläche an der Gesamtgesichtsfeldfläche. Am 14. Tag nach Implantation beträgt der Anteil der Lumenfläche an der Gesamtgesichtsfeldfläche innerhalb des Tx-Gewebes 2.901% (SA: 0.518) in Gruppe 1, 3.272% (SA: 1.626) in Gruppe 2 und 5.102% (SD: 0.921) in Gruppe 3. Während Co-Tx autologer Fibroblasten keinen signifikanten ($p=0.728$) Einfluss auf die Tx-Perfusion an Tag 14 zeigt, bedingt Injektion VEGF-transgener Fibroblasten eine signifikante ($p=0.040$) Hypervaskularisation (Abb. 41).

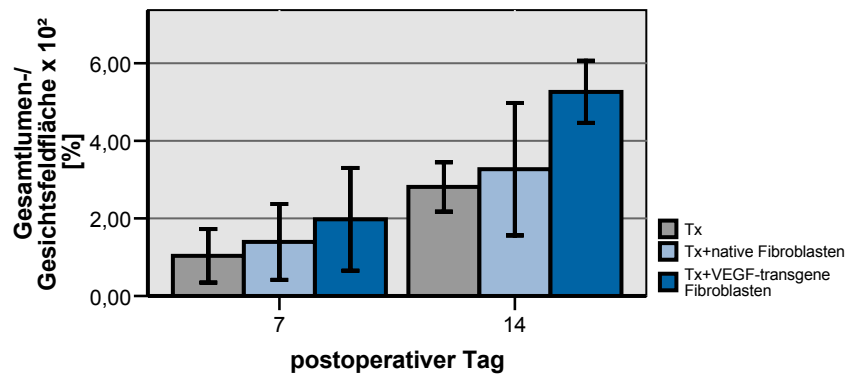


Abb. 41 Bar-Plot zur Darstellung des Anteils der Gesamtlumenfläche der Gefäße innerhalb der ADMs an der Gesamtgesichtsfeldfläche bei 400× Originalvergrößerung über die Zeit; die dargestellten Balken entsprechen Mittelwert und SA.

6 DISKUSSION

6.1 Das azelluläre, dermale Allo-Tx

Azelluläre, dermale Allo-Tx werden klinisch vielfältig angewandt. Hauptindikation stellt dabei die Brandchirurgie dar (Truong et al. 2005, Ehrenreich und Ruszczak 2006). Im Rahmen der Weichgewebesubstitution liegt der Applikationsschwerpunkt vor allem im Bereich der Deckung gingivaler Rezessionen sowie der Lippenaugmentation (Castor et al. 1999, Gyskiewicz 2000, Abenavoli et al. 2002).

Über ein Sensibilisierungspotential der Matrix wurde bislang nicht berichtet. Ursächlich ist dafür ihre Azellularität. Das Fasernetz der Dermis ist hoch konserviert und wirkt allein nicht immunogen (Pachence 1996). Die biologische Matrix an sich ist weder mutagen, teratogen, cancerogen noch cytotoxisch (Walter et al. 1998). Folglich darf bei Applikation eines allogenen, azellulären Allo-Tx zur Weichgewebeaugmentation von einer guten Biokompatibilität ausgegangen werden.

Azelluläre, dermale Allo-Tx erweisen sich in-vitro als relativ resistent gegen Collagenase-vermittelte Degradation, was wahrscheinlich auf den hohen Grad an Quervernetzungen zwischen den Einzelfasern zurückzuführen ist (Truong et al. 2005). Bei der klinischen Anwendung wird jedoch das Phänomen einer interindividuell sehr verschiedenen Dimensionsstabilität als problematisch beurteilt (Terino 2001).

Durch eine mittlere Porengröße von 36.25 µm (Pins et al. 2000) und zusätzliche Ausbildung von Shunt-Strukturen im Bereich von Haarfollikeln sowie Schweißdrüsen (Srivastava et al. 1999) ist eine entsprechende Substanzdurchlässigkeit der Matrix gewährleistet.

Die kontinuierliche Basalmembran, die vor allem aus Laminin und Kollagen IV aufgebaut ist (Walter et al. 1998), fördert in idealer Weise Adhäsion, Proliferation und Migration von polarisierten Epithelzellen (Ehrenreich und Ruszczak 2006). Die Dermis-Fasern, vorwiegend COL I und III (Walter et al. 1998), sowie die azellulären Gefäßkanäle dienen als Leitschiene für die Migration von Fibroblasten respektive Endothelzellen in das Tx (Hynes 1992, Juliano und Haskill 1993, Giancotti und Ruoslahti 1999, Zervolea et al. 2000).

Große Nachteile besitzen die azellulären, dermalen Allo-Tx jedoch hinsichtlich der gewinnungs- und verarbeitungsbezogenen Anforderungen an ein Biomaterial.

Die Zahl freiwilliger Hautspender limitiert die Verfügbarkeit des Materials (Srivastava et al. 1999). Um eine Übertragung verschiedener Krankheiten zu verhindern muss für jeden Spender zunächst ein aufwendiges Screening durchgeführt werden, wodurch die Kosten enorm steigen (Truong et al. 2005). Obwohl der Herstellungsprozess standardisierbar ist, sind die Produkte in Folge ihres natürlichen Ursprungs untereinander sehr inhomogen (Srivastava et al. 1999). Diese Inhomogenität wurde jedoch in vorliegender Studie durch Nutzung nur eines Hautspenders minimiert.

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Entfernung beziehungsweise Inaktivierung von Zellen in Haut beschrieben, wie die Applikation von Frier–Tau–Zyklen (Krejci et al. 1991), Enzymen (Takami et al. 1996), hygroskopischen (Chakrabarty et al. 1999), wässrigen (Krejci et al. 1991), hyperosmolaren oder detergenzhaltigen Lösungen (Livesey et al. 1995). Wobei die Dispase II- / Triton X 100–Methode als eine der effizientesten und schonendsten zugleich bezeichnet werden kann (Walter et al. 1998).

6.2 Tiermodell

Es existieren vielfältige etablierte in-vivo Modelle, die sich zur Untersuchung der Biointegration nach Implantation von Biomaterialien eignen.

Der Chorion-Allantois- Membran-Assay ist eine einfache Screening-Methode zur Untersuchung der Neovaskularisation bioartefizieller Gewebe nach Transplantation (Laschke et al. 2006). Hierbei wird das entsprechende Implantat auf die Chorion- Allantois-Membran eines Hühnereies des 3. Bruttages aufgelegt. Da die Hühnerembryonen zu diesem Zeitpunkt kein eigenes Immunsystem besitzen, kann einerseits xenogenes Gewebe jeglicher Art implantiert werden, andererseits ist jedoch keine Biokompatibilität zu untersuchen (Laschke et al. 2006).

Das Rückenhautkammermodell wurde erstmals von Algire 1943 vorgestellt (Algire 1943) und stellt ein etabliertes Verfahren für standardisierte in-vivo Mikrozirkulationsstudien dar. Der Rücken des anästhesierten Tieres wird enthaart und zwei symmetrische Titanrahmen werden in die Rückenhautfalte implantiert. Eine Hautschicht, bestehend aus Haut, Panniculus carnosus und Unterhautgewebe, wird im Bereich des zirkulären Fensters des Rahmens komplett entfernt. Die Wunde wird mit einem Deckglas abgedeckt. Um eine Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch das chirurgische Trauma zu vermeiden werden die Experimente erst nach einer Latenz von 48 h begonnen (Laschke et al. 2006). Die

Neovaskularisation von Biomaterialien nach Implantation kann mit Hilfe dieses Modelles über 3–4 Wochen am unnarkotisierten Tier unter Nutzung der Methoden der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden (Menger et al. 1990a, Menger et al. 1990b, Menger et al. 1992, Kraft et al. 2000, Kraft et al. 2001, Rucker et al. 2006).

Die einfache Implantation von Biomaterialien oder in-vitro hergestelltem Gewebeersatz in subcutane Taschen ist eines der etabliertesten Verfahren in der Biokompatibilitäts- und integrationsprüfung (Rodella et al. 2006). Als Implantationsorte wurden vor allem der Rücken zwischen den Scapulae (Patrick et al. 2002, Kimura et al. 2003) sowie die Leistenregion (Schultze-Mosgau et al. 2004a, Elcin und Elcin 2006, Kneser et al. 2006) beschrieben.

6.3 Charakterisierung der Grenzflächenreaktion zwischen azellulärem, dermalen Allo-Tx und umliegendem Bindegewebe

6.3.1 Das Cytokinmilieu

Nach s.c. Implantation kommt es zu Wechselwirkungen des azellulären, dermalen Allo-Tx mit dem umliegenden Bindegewebe, die eine Veränderung im periimplantären Cytokinmilieu bedingen.

TGF- β_1 ist der Prototyp eines Mitgliedes der TGF- β -Superfamilie. Es wird als 24- kDa-Homodimer sezerniert, dass nicht-kovalent mit dem Latency Associated Peptide (LAP) assoziiert ist (de Caestecker 2004). Dieses 80-kDa Peptid ermöglicht die effiziente Sekretion sowie Bereitstellung von TGF- β in schnell verfügbaren extrazellulären Depots, verhindert jedoch die unspezifische Bindung an ubiquitäre Oberflächenrezeptoren (Govinden und Bhoola 2003). In physiologischen Konzentrationen erhöht TGF- β_1 die Reißfestigkeit und beschleunigt die Heilung von Inzisionswunden (Mustoe et al. 1987). In Folge dieser Eigenschaften wird das Cytokin als potentes Pharmakon zur Verbesserung der normalen Wundheilung angesehen (Brown et al. 1988, McGee et al. 1989). Im Überschuss führt TGF- β_1 jedoch zu Vernarbung (Shah et al. 1995), Fibrosierung (Border und Noble 1994) und Reduktion der Wundreißfestigkeit (Bernstein et al. 1993).

Nach s.c. Implantation eines azellulären, dermalen Allo-Tx kommt es zwischen Tag 0 und 7 zu einem signifikanten TGF- β_1 -Expressionsanstieg gefolgt von einem signifikanten Expressionsabfall zwischen Tag 7 und 14. Im, mit 30Gy vorbestrahlten, cervicalen Transplantatlager der Wistar-Ratte konnte während der Einheilung eines freien, vaskulären Grazilis-Tx bereits am 3. Tag ein TGF- β_1 -Peak detektiert und auf verstärkte Aktivierung latenten Cytokins zurückgeführt werden. Der nachfolgende Abfall der Expression im Transplantatlager bis zum Tag 14 (Schultze-Mosgau et al. 2002c) korreliert mit den Daten im Heilungsbereich der Allo-Tx vorliegender Studie. Im Verlaufe der Heilung einer Vollhaut-Inzisionswunde auf dem Rücken gesunder Mäuse kommt es im Gegensatz dazu zu einer Elevation der TGF- β_1 -Expression an Tag 1 und einem Abfall der Expression unter die Detektionsgrenze bis zu Tag 3 (Ashcroft et al. 1999).

Die VEGF Proteinfamilie besteht aus 7 Faktoren VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Placental Growth Factor (PlGF) und VEGF-F (Ferrara et al. 2003). Die weitaus bedeutendste Isoform stellt dabei VEGF-A 165 dar (Dor et al. 2001). VEGF A, auch VEGF im engeren

Sinne, ist ein Heparin-bindendes Glycoprotein, dass als 45 kDa-Homodimer sezerniert wird (Park et al. 1993). Es handelt sich dabei um einen proangiogenen Faktor, der in erster Linie Migration, Proliferation und Überleben von Endothelzellen fördert (Otrock et al. 2007). Außerdem erhöht VEGF die Permeabilität vaskulärer Endothelien und kann so die Nährstoffversorgung im Gewebe verbessern (Hippenstiel et al. 1998). VEGF ist von außerordentlicher Bedeutung im Rahmen der Wundheilung. Am Beispiel ischämischer Wunden konnte gezeigt werden, dass topische Cytokin-Applikation die Neovaskularisation des Granulationsgewebes unterstützt und die Wundreißfestigkeit erhöht (Zhang et al. 2003).

Über den gesamten Untersuchungszeitraum kommt es im Heilungsbereich zu einer Expressionsverminderung für VEGF. Dieses Profil entspricht den Verhältnissen, die für die Einheilung mikrovaskulärer Weichgewebetransplantate im ersatzschwachen Lagergewebe nach Radiatio beschrieben wurden (Schultze-Mosgau et al. 2003a).

6.3.2 Die Gewebereorganisation

Nach Implantation eines azellulären, dermalen Allo-Tx kommt es zu einem fibrokontraktilen Umbau des periimplantären Bindegewebes. Eine basale α -SMA-Expression von 12,765% im gesunden Gewebe korreliert mit den Daten von van Beurden et al. die in einem Übersichtsartikel über einen Anteil von Myofibroblasten an der Gesamtzahl subepithelialer, palatinaler Fibroblasten von 9% berichten (van Beurden et al. 2005).

Ruhende Fibroblasten exprimieren kein α -SMA. Nach Umwandlung in Myofibroblasten im Rahmen fibrokontraktiler Prozesse kommt es jedoch zu einer Induktion der Expression glattemuskulären Aktins (Kopp et al. 2005).

Für die Transformation des Fibroblasten zum Myofibroblasten ist das Ineinandergreifen zweier, distinkter Prozesse erforderlich.

Integrin-Rezeptoren, vom Typ $\alpha_2\beta_1$, werden auf der Fibroblastenoberfläche verstärkt exprimiert (Klein et al. 1991, Schiro et al. 1991). Derartige Rezeptoren vermitteln die Interaktion von Fibroblasten mit COL-Fasern der ECM (Wayner und Carter 1987, Kirchhofer et al. 1990). Durch die Adhäsion der Fibroblasten an Strukturen der ECM kommt es zum Aufbau intrazellulärer Spannung (Hautmann et al. 1997). Diese ist Voraussetzung für die TGF- β_1 -abhängige α -SMA – Induktion (Arora et al. 1999).

Für die Cytokine der TGF- β -Familie wurden distinkte Funktionen im Rahmen profibrotischer Gewebereaktionen gefunden. Während TGF- β_1 und TGF- β_2 als Promotoren profibrotischer Prozesse anzusehen sind (Kuhn et al. 2000, Schultze-Mosgau et al. 2002c). Konnte für TGF- β_3 ein eindeutig antifibrotischer und vaskularisationsfördernder Effekt gefunden werden (Schultze-Mosgau et al. 2003c). TGF- β_1 vermittelt Signale vor allem über den TGF- β -Rezeptor II, für den eine Überexpression im Rahmen profibrotischer Heilungsstörungen nachgewiesen werden konnte (Schultze-Mosgau et al. 2003b). Nach Ligandierung kommt es zur Komplexbildung mit dem TGF- β -Rezeptor I sowie dessen Phosphorylierung. Die phosphorylierten Seitenketten des Rezeptors stellen nun kompetente Bindungsplätze für das Adapterprotein SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) dar. Dieses Protein vermittelt Assoziation und Rezeptor-abhängige Phosphorylierung von Smad2 und/ oder 3. Nach Phosphorylierung bilden diese Proteine einen Komplex mit

Smad 4 und translozieren in den Nucleus. Hier interagieren die Smad-Proteine direkt mit DNA oder DNA-bindenden Proteinen, wie FAST1 oder Fos/ Jun, und regulieren die Transkription verschiedener Zielgene (Govinden und Bhoola 2003). Als natürlicher Inhibitor

dieses hoch konservierten Smad–Weges wirkt Smad 7 (Miyazawa et al. 2002). Dessen Unterdrückung wird als eine der Hauptursachen für gesteigerte nukleoplasmatische Translokation aktiver Smad2/3–Smad4–Komplexe und damit verbundene exzessive Zielgenaktivierung im Rahmen profibrotischer Wundheilungsstörungen diskutiert (Schultze-Mosgau et al. 2004b). α -SMA ist dabei als eines der wesentlichen Smad–aktivierten Gene anzusehen, dessen Expression durch Smad 7 inhibiert wird (Kopp et al. 2005).

Nach Implantation azellulärer, dermalen Allo-Tx kommt es zu einer signifikanten Myofibroblastenakkumulation mit Persistenz bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes. Der Anstieg der Myofibroblastenzahl korreliert positiv mit dem Anstieg der TGF- β 1-Konzentration. Auch Fernandez-Cossio und Castano-Oreja konnten im Rattenmodell nach Injektion von Hyaluronsäure ein Einsetzen des fibrokontraktilen Gewebeumbaus am 7. Tag nach Implantation feststellen (Fernandez-Cossio und Castano-Oreja 2006). Nach subcutaner Implantation resorbierbarer 4–0 Fäden aus Polydioxanon oder Poliglecapron konnten in Ratten sogar bereits am 3. p. op. Tag periimplantäre Myofibroblastenakkumulationen nachgewiesen werden (Andrade et al. 2006). Klinisch wurde das Problem periimplantärer fibrokontraktiler Malformationen, vor allem nach Einsatz von Silikonimplantaten zur Mammaaugmentation bei 0.5–30% aller Patientinnen beschrieben (Zahavi et al. 2006, Spano et al. 2008). Nach Operation wird hier jedoch bis zum klinischen Auftreten einer konstriktiven Fibrose eine Latenz von mindestens 6 Monaten berechnet (Panettiere et al. 2007). Dieser Latenzunterschied ist vor allem auf die Beurteilung subklinischer Zustände im Tierversuch, die 3 bis 4 fach höhere metabolische Aktivität der Nager sowie die unterschiedliche Struktur der verwendeten Gewebeersatzmaterialien zurückzuführen (Schultze-Mosgau et al. 2003a).

CD105 (Endoglin), ein Typ I Transmembranprotein, wird sowohl auf endothelialen Progenitorzellen (Asahara et al. 1997, Shi et al. 1998) als auch auf reifen Endothelzellen (Burrows et al. 1995) exprimiert. Im Gegensatz zu CD31 zeigt es keine Kreuzreaktivität mit der Oberfläche von Entzündungszellen (Piali et al. 1995) und besitzt folglich gute Eignung zur Evaluation der neovaskulatorischen Gesamtaktivität nach Implantation eines Gewebeersatzmaterials.

Vor Implantation entspricht die periimplantäre Kapillarisation, den für Rattenhaut üblichen Werten (Schultze-Mosgau et al. 2002a). Nach Implantation der Allo-Tx bleiben periimplantäre Kapillarzahl sowie Lumenfläche bis zum 7. p.op. Tag konstant. Zwischen 7. und 14. p. op. Tag zeigen sie signifikante Regression. Diese Regression korreliert positiv mit der TGF- β 1- und VEGF-Expressionsabnahme.

TGF-beta₁ wird im Rahmen profibrotischer Prozesse vor allem im perivaskulären Bereich hochreguliert (Schultze-Mosgau et al. 2002c). Durch Induktion von Enzymen der ECM-Synthese, wie Prolyl-Hydroxy-Prolinase-beta (Schultze-Mosgau et al. 2004b), und Inhibition matrixdegradierender Enzyme durch Überexpression von Gewebeinhibitoren, wie PAI-I (Schultze-Mosgau et al. 2006) kommt es mit einer zeitlichen Latenz (Rahimi und Leof 2007) zur Akkumulation von kollagenen Fasern. Die Folgen sind perikapilläre Fibrosierung, unregelmäßige Kapillarverteilung sowie Verringerung der Lumenfläche (Schultze-Mosgau et al. 2002b, Schultze-Mosgau et al. 2002a).

VEGF interagiert mit den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, VEGFR-I und VEGFR-2 (Ferrara et al. 2003). Diese Rezeptoren besitzen eine extrazelluläre, Ig-artige Cytokinbindungsdomäne, die durch einen transmembranären Anker mit der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne verbunden ist (Breen 2007). Während VEGFR-I als Decoy-Rezeptor die Verfügbarkeit von VEGF reguliert (Park et al. 1994) stellt VEGFR-2 den wichtigsten Rezeptor zur Vermittlung mitogener Signale dar (Khosravi Shahi und Fernandez Pineda 2008). In Abwesenheit von VEGF kommt es zur Dedifferenzierung und Dysfunktionalisierung von Endothelzellen. Die Folge ist eine Regression der Gefäße (Tang et al. 2004).

6.3.3 Die Neovaskularisation des Allo-Tx

Während zwischen Implantation und 7. post operativen Tag die Zahl der Gefäße im Tx zunimmt kommt es zwischen 7. und 14 post operativen Tag zu einer Vergrößerung der Lumenfläche.

Auch in einer Studienserie von Rücker et al. konnte unter Nutzung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ein Beginn der Kapillarbildung in den Randbereichen von Poly-(D,L-Lactide-Co-Glycolide)–Scaffolds, synthetischem Hydroxylapatit sowie azellulärem Dentin 3 Tage post implantationem ermittelt werden. Nach dem 7. Implantationstag kam es zu keiner weiteren Zunahme der Kapillarzahl, vielmehr wurde die Perfusion durch Vergrößerung des kapillären Querschnittes verbessert (Rucker et al. 2006, Rucker et al. 2007).

Neovaskularisation erfolgt durch zwei distinkte Mechanismen, die als Vaskulogenese und Angiogenese bezeichnet werden (Velazquez 2007). Angiogenese bezeichnet die Entstehung neuer Kapillaren aus bestehenden Gefäßen durch Aussprossung oder Intussuszeption (Risau 1997, Carmeliet 2000). Vaskulogenese bedeutet hingegen die de novo Formierung neuer Kapillaren aus endothelialen Progenitorzellen (Sepulveda et al. 2007).

Zur Initiation der Neovaskularisation sind Stimulatoren erforderlich, die vor allem unter hypoxischen Bedingungen freigesetzt werden. Im vorliegenden Modell entsteht eine Gewebe - Ischämie hauptsächlich durch Operation und Einbringen eines avaskulären, separierenden Biomaterials. Somit werden die der Hautversorgung dienenden muskulo–oder fasziocutanen Perforansgefäße durchtrennt. Die Folge ist eine Ischämie der, das Implantat bedeckenden Haut (Tepper et al. 2005).

Durch hypoxiebedingte Ausschüttung angiogener Faktoren kommt es initial zu einer Freisetzung proteolytischer Enzyme aus Endothelzellen und Pericyten ortsständiger Kapillaren des periimplantären Gewebes (Nicosia und Villaschi 1999). Diese Proteasen gehören in erster Linie zur Familie der MMPs (Mignatti und Rifkin 1996) und degradieren die kapilläre Basalmembran (Dvorak et al. 1995) sowie lokale ECM (Mignatti und Rifkin 1996). Endothelzellen, lösen sich von ihren Nachbarzellen, bevor sie in das randständige Implantatgewebe invadieren können. Maßgeblich beteiligt sind hierbei Zelladhäsionsmoleküle (Bischoff 1997). Im Anschluss beginnen, die aus dem Gewebeverbund gelösten Zellen, chemotaktisch in Richtung des

angiogenen Stimulus zu migrieren. Die Verlängerung des entstandenen Endothelzellsprosses erfolgt durch Proliferation der Endothelzellen an dessen Basis. Dabei

werden die Zellen durch proangiogene Faktoren, die zum Teil aus der degradierten Matrix freigesetzt werden, stimuliert (Slevin et al. 1998).

Eine solche Proliferation konnte auch in einer Studie von Popa et al. vom 3. bis 10. Tag nach Implantation von Dacron®-Patches in dorsale, subcutane Taschen in C57B / 6-Mäusen, durch eine verstärkte nukleäre Akkumulation von Bromdesoxyuridin (BrdU) in Endothelzellen des umliegenden Gewebes belegt werden (Popa et al. 2007) und ist wahrscheinlich Ursache der Verteilungsinhomogenität der CD105 positiven Strukturen beider Gruppen mit bevorzugter Lokalisation am Implantatrand.

Die Kanalisierung der neu gebildeten Endothelstränge ist derzeit nicht im Detail verstanden. Im Rahmen von in – vitro Untersuchungen konnten bisher jedoch zwei Mechanismen verifiziert werden, deren Beteiligung als gesichert gilt:

- Ultrastrukturell ließen sich im Intrazellularraum der Endothelzellen Vakuolen mit amorphem Inhalt nachweisen. Die Vakuolen benachbarter Zellen konfluieren zu einer tubulären Struktur, dem späteren Lumen (Meyer et al. 1997, Bayless et al. 2000, Bayless und Davis 2002).
- Desweiteren konnte gezeigt werden, dass es im Zentrum solider Endothelstränge zur Nährstoffdeprivation der Zellen kommt. In Folge dessen werden die Zellen apoptotisch und gehen zu Grunde. Es konnte zumindest für einen Teil des amorphen Inhaltes in neu gebildeten tubulären Strukturen die Identität apoptotischer Zelltrümmer belegt werden (Meredith et al. 1993, Peters et al. 2002).

SCF (stem cell factor) vermittelt im unstimulierten Zustand die Immobilisation endothelialer Vorläufer im Knochenmark durch Induktion cytoadhäsiver Bindungen an Stromazellen. Die in Folge der lokalen cutanen Ischämie freigesetzten Wachstumsfaktoren/ Cytokinen, wie VEGF (Tepper et al. 2005), bFGF (Schumacher et al. 1998) oder G-CSF (Neben et al. 1993, Shi et al. 1998) werden über den Blutstrom ins Knochenmark gebracht (Takahashi et al. 1999, Aicher et al. 2005). Wenn sie hier einen gewissen Schwellenwert erreichen kommt es zu einer, bislang noch nicht vollständig geklärten, Veränderung der funktionellen Mikroumgebung, der Nische, der endothelialen Progenitorzellen. Eine Aktivierung der eNOS gilt als gesichert (Goldstein et al. 2006, Aicher et al. 2003). Unter Beteiligung von NO kommt es down – stream zu einer Aktivierung von Proteasen, unter denen vor allem MMP-9 eine herausragende Bedeutung zukommt (Heissig et al. 2003, Heissig et al. 2002, Rafii et al.

2003). Die Proteasen spalten membrangebundenen kit-Liganden in die lösliche Form. L-kit, solubler kit-Ligand, blockiert seinerseits wahrscheinlich SCF und führt somit zu einer Proliferation und Mobilisation der endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark (Shintani et al. 2001, Nakamura et al. 2004).

Das Gefäßendothel zeigt im hypoxischen Gebiet bislang noch nicht vollkommen geklärte Alterationen (Tepper et al. 2005) wodurch es zu einer Extravasation der endothelialen Progenitorzellen kommt. Unter anderem führt eine reduzierte O₂- Spannung zu verstärkter Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1, der SDF-1- Expression induziert. SDF-1 ist seinerseits an der Rekrutierung von EPCs über den Oberflächenrezeptor CXCR4 ins hypoxische Gewebe beteiligt (Ceradini et al. 2004, Dumstrei et al. 2004, Reichman-Fried et al. 2004, Ceradini und Gurtner 2005).

In einer Studie von Tepper et al. konnten 72 Stunden nach Setzen einer Ischämie im Tiermodell erste endotheliale Progenitoren im Gewebe detektiert werden (Tepper et al. 2005). Die rekrutierten Progenitoren können grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen zur Neovaskularisation beitragen:

- Zum einen können die endothelialen Progenitorzellen durch Sekretion von Cytokinen die Kapillarbildung durch Aussprossung aus ortsständigen Gefäßen, die Angiogenese protegieren (Kocher et al. 2001).
- Andererseits aber auch selbst im Sinne einer Vaskulogenese zu Kapillaren assemblieren.

6.4 Therapeutische Angiogenese durch ex-vivo Gentherapie

In Folge ihrer zentralen Rolle in der Steuerung der Prozesse der Neovaskularisation zeigen Cytokine, wie VEGF, exzellente Eignung zur Modulation der Prozesse der Biointegration von artefiziellen, subcutanen Augmentationsmaterialien.

Kurze Halbwertszeiten in Folge rascher Degradation sowie Abdiffusion mit der konsekutiven Gefahr ungewollter angiogener Effekte an entfernten Stellen machen topische oder systemische Gabe undiskutabel (Yancopoulos et al. 2000, Laschke et al. 2006). Es konnte sogar experimentell nachgewiesen werden, dass von der Gabe rekombinanter Proteine in freier Form keine nennenswerten angiogenen Effekte im bioartefiziellen Implantat ausgehen (Tabata et al. 1999).

Transplantation transfizierter Target-Zellen stellt eine Möglichkeit zur topischen und prolongierten Wachstumsfaktorfreisetzung dar (Supp und Boyce 2002). Mukosale Fibroblasten zeigen eine besonders günstige Eignung als Gensphären. Die enorale Biopsie-Wunde heilt rasch durch freie Granulation und die Zellen proliferieren in Folge ihres embryonalen Phänotyps unter Standardkulturbedingungen (Stephens et al. 2001). Die bei der Fibroblasten-Nukleofektion erreichte Effizienz von rund 63% und Persistenz der Transgenexpression von ungefähr 9 Tagen ist in Übereinstimmung mit Daten von Zaragosi et al., die eine transiente Nukleofektion von Adipocyten durchführten (Zaragosi et al. 2007).

Durch Transplantation VEGF-transgener Zellen wird im Heilungsbereich die VEGF-Expression erhöht und eine adäquate Perfusion bleibt erhalten. Dies bedingt eine Beschleunigung der Neovaskularisation der Allo-Tx. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Daten von Yi et al., die nach Tx von 5×10^5 VEGF-transgener EPCs unter einen überdimensionierten, cranial gestielten Rückenhautlappen eine signifikante Vergrößerung der Überlebensfläche erzielen konnten (Yi et al. 2006). Auch Rinsch et al. fanden nach Tx von 5×10^5 VEGF-transgenen, enkapsulierte Myoblasten eine signifikante Erhöhung der Gefäßdichte im Modell des kritisch perfundierten Rückenlappens, konnten aber keine makroskopische Verbesserung in der Überlebensfläche erzielen (Rinsch et al. 2001).

7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Azelluläre, dermale Allo-Tx wurden 1992 erstmals für die Versorgung großflächiger Brandwunden beschrieben. Limitation transplantierbarer Gewebe sowie Morbidität der Donorstellen führte zur Anwendung dieser artefiziellen Weichgewebesubstitute in zahlreichen weiteren Indikationsgebieten wie Deckung gingivaler Rezessionen, Lippenaugmentation, Interponat bei Palatoplastik oder Spacer bei der Behandlung von Lidretraktionen. Die Ergebnisse der klinischen Studien waren jedoch sehr variabel. In-vitro Studien gaben erste Hinweise auf eine Induktion fibrotischer Prozesse durch azelluläre, dermale Allo-Tx.

Im Rahmen vorliegender in-vivo Studie konnte nach s.c. Implantation azellulärer dermaler Allo-Tx im Rattenmodell eine profibrotisch-antiangiogene Verschiebung im Cytokinmilieu des Heilungsbereiches gefunden werden. Für das Bindegewebe war außerdem eine fibrokontraktile Reorganisation, die eng mit den Cytokinverschiebungen korreliert, zu konstatieren. Eine Interferenz mit der Neovaskularisation der Tx, die deren Einheilung bis zum 14. Tag verzögert, war nachzuweisen.

Durch Nukleofektion konnten autologe Zellen effizient transfiziert werden und eine transiente Genexpression bis Tag 9 war nachweisbar.

Nach Implantation VEGF-transgener Zellen in den Heilungsbereich azellulärer dermaler Allo-Tx konnte eine signifikante Erhöhung der VEGF-Expression über den gesamten Untersuchungszeitraum verglichen mit Kontrollen erzielt werden. Dies verhinderte eine Verschlechterung der periimplantären Perfusion und beschleunigte die Neovaskularisation der Allo-Tx.

Durch therapeutische Angiogenese mittels ex-vivo Gentherapie konnten profibrotische Veränderungen der Gefäße im Einheilungsbereich azellulärer, dermaler Allo-Tx so moduliert werden, dass die Biointegration der Tx stimuliert und eine physiologische Heilungssituation hergestellt wurde.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abenavoli FM. 2005. Usefulness of Alloderm. *Plast Reconstr Surg*, 116 (2):677.
- Abenavoli FM, Corelli R, Vittori I. 2002. Use of AlloDerm for lip reaugmentation. *Ann Plast Surg*, 48 (4):447-448.
- Adams RH, Alitalo K. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (6):464-478.
- Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. 2005. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*, 45 (3):321-325.
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*, 9 (11):1370-1376.
- Algire GH. 1943. An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst*, 4 (1)
- Andrade MG, Weissman R, Reis SR. 2006. Tissue reaction and surface morphology of absorbable sutures after in vivo exposure. *J Mater Sci Mater Med*, 17 (10):949-961.
- Arora PD, Narani N, McCulloch CA. 1999. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am J Pathol*, 154 (3):871-882.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275 (5302):964-967.
- Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB. 1999. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol*, 1 (5):260-266.
- Batista EL, Jr., Batista FC, Novaes AB, Jr. 2001. Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *J Periodontol*, 72 (2):265-273.
- Bayless KJ, Davis GE. 2002. The Cdc42 and Rac1 GTPases are required for capillary lumen formation in three-dimensional extracellular matrices. *J Cell Sci*, 115 (Pt 6):1123-1136.
- Bayless KJ, Salazar R, Davis GE. 2000. RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. *Am J Pathol*, 156 (5):1673-1683.

- Bernstein EF, Salomon GD, Harisiadis L, Talbot T, Harrington F, Russo A, Uitto J. 1993. Collagen gene expression and wound strength in normal and radiation-impaired wounds. A model of radiation-impaired wound healing. *J Dermatol Surg Oncol*, 19 (6):564-570.
- Bischoff J. 1997. Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest*, 100 (11 Suppl):S37-39.
- Border WA, Noble NA. 1994. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*, 331 (19):1286-1292.
- Breen EC. 2007. VEGF in biological control. *J Cell Biochem*, 102 (6):1358-1367.
- Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, von Fraunhofer A, Schultz GS. 1988. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg*, 208 (6):788-794.
- Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE. 1995. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res*, 1 (12):1623-1634.
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6 (4):389-395.
- Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438 (7070):932-936.
- Castor SA, To WC, Papay FA. 1999. Lip augmentation with AlloDerm acellular allogenic dermal graft and fat autograft: A comparison with autologous fat injection alone. *Aesthetic Plast Surg*, 23 (3):218-223.
- Ceradini DJ, Gurtner GC. 2005. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med*, 15 (2):57-63.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 10 (8):858-864.
- Chakrabarty KH, Dawson RA, Harris P, Layton C, Babu M, Gould L, Phillips J, Leigh I, Green C, Freedlander E, Mac Neil S. 1999. Development of autologous human dermal-epidermal composites based on sterilized human allodermis for clinical use. *Br J Dermatol*, 141 (5):811-823.
- Clark JM, Saffold SH, Israel JM. 2003. Decellularized dermal grafting in cleft palate repair. *Arch Facial Plast Surg*, 5 (1):40-44; discussion 45.
- Cole P, Horn TW, Thaller S. 2006. The use of decellularized dermal grafting (AlloDerm) in persistent oro-nasal fistulas after tertiary cleft palate repair. *J Craniofac Surg*, 17 (4):636-641.
- Cristiano RJ. 1998. Viral and non-viral vectors for cancer gene therapy. *Anticancer Res*, 18 (5A):3241-3245.

- de Caestecker M. 2004. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15 (1):1-11.
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122 (1):103-111.
- Dor Y, Porat R, Keshet E. 2001. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280 (6):C1367-1374.
- Dumstrei K, Mennecke R, Raz E. 2004. Signaling pathways controlling primordial germ cell migration in zebrafish. *J Cell Sci*, 117 (Pt 20):4787-4795.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, 146 (5):1029-1039.
- Ehrenreich M, Ruszczak Z. 2006. Update on dermal substitutes. *Acta Dermatovenerol Croat*, 14 (3):172-187.
- Elcin AE, Elcin YM. 2006. Localized angiogenesis induced by human vascular endothelial growth factor-activated PLGA sponge. *Tissue Eng*, 12 (4):959-968.
- Elcin YM, Dixit V, Gitnick G. 2001. Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. *Artif Organs*, 25 (7):558-565.
- Emory RE, Jr., Clay RP, Bite U, Jackson IT. 1997. Fistula formation and repair after palatal closure: an institutional perspective. *Plast Reconstr Surg*, 99 (6):1535-1538.
- Fernandez-Cossio S, Castano-Oreja MT. 2006. Biocompatibility of two novel dermal fillers: histological evaluation of implants of a hyaluronic acid filler and a polyacrylamide filler. *Plast Reconstr Surg*, 117 (6):1789-1796.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9 (6):669-676.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science*, 285 (5430):1028-1032.
- Goldstein LJ, Gallagher KA, Bauer SM, Bauer RJ, Baireddy V, Liu ZJ, Buerk DG, Thom SR, Velazquez OC. 2006. Endothelial progenitor cell release into circulation is triggered by hyperoxia-induced increases in bone marrow nitric oxide. *Stem Cells*, 24 (10):2309-2318.
- Govinden R, Bhoola KD. 2003. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther*, 98 (2):257-265.
- Gryskiewicz JM. 2000. Alloderm lip augmentation. *Plast Reconstr Surg*, 106 (4):953-954.

- Gupta A, Zahriya K, Mullens PL, Salmassi S, Keshishian A. 2006. Ventral herniorrhaphy: experience with two different biosynthetic mesh materials, Surgisis and Alloderm. *Hernia*, 10 (5):419-425.
- Harris RJ. 2001. Gingival augmentation with an acellular dermal matrix: human histologic evaluation of a case--placement of the graft on bone. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 21 (1):69-75.
- Hautmann MB, Madsen CS, Owens GK. 1997. A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *J Biol Chem*, 272 (16):10948-10956.
- Heissig B, Werb Z, Rafii S, Hattori K. 2003. Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis. *Thromb Haemost*, 90 (4):570-576.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. 2002. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 109 (5):625-637.
- Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A, Risau W, Clauss M, Suttrop N. 1998. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am J Physiol*, 274 (5 Pt 1):L678-684.
- Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69 (1):11-25.
- Juliano RL, Haskill S. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol*, 120 (3):577-585.
- Kang SW, Lim HW, Seo SW, Jeon O, Lee M, Kim BS. 2008. Nanosphere-mediated delivery of vascular endothelial growth factor gene for therapeutic angiogenesis in mouse ischemic limbs. *Biomaterials*, 29 (8):1109-1117.
- Khosravi Shahi P, Fernandez Pineda I. 2008. Tumoral angiogenesis: review of the literature. *Cancer Invest*, 26 (1):104-108.
- Kim TK, Burgess DJ. 2002. Pharmacokinetic characterization of ¹⁴C-vascular endothelial growth factor controlled release microspheres using a rat model. *J Pharm Pharmacol*, 54 (7):897-905.
- Kimura Y, Ozeki M, Inamoto T, Tabata Y. 2003. Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 24 (14):2513-2521.
- Kirchhofer D, Languino LR, Ruoslahti E, Pierschbacher MD. 1990. Alpha 2 beta 1 integrins from different cell types show different binding specificities. *J Biol Chem*, 265 (2):615-618.
- Klein CE, Dressel D, Steinmayer T, Mauch C, Eckes B, Krieg T, Bankert RB, Weber L. 1991. Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *J Cell Biol*, 115 (5):1427-1436.
- Kneser U, Polykandriotis E, Ohnolz J, Heidner K, Grabinger L, Euler S, Amann KU, Hess A, Brune K, Greil P, Sturzl M, Horch RE. 2006. Engineering of vascularized transplantable bone tissues:

- induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop. *Tissue Eng*, 12 (7):1721-1731.
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. 2001. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 7 (4):430-436.
- Kopp J, Preis E, Said H, Hafemann B, Wickert L, Gressner AM, Pallua N, Dooley S. 2005. Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, 280 (22):21570-21576.
- Kraft CN, Hansis M, Arens S, Menger MD, Vollmar B. 2000. Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res*, 49 (2):192-199.
- Kraft CN, Burian B, Perlick L, Wimmer MA, Wallny T, Schmitt O, Diedrich O. 2001. Impact of a nickel-reduced stainless steel implant on striated muscle microcirculation: a comparative in vivo study. *J Biomed Mater Res*, 57 (3):404-412.
- Krejci NC, Cuono CB, Langdon RC, McGuire J. 1991. In vitro reconstitution of skin: fibroblasts facilitate keratinocyte growth and differentiation on acellular reticular dermis. *J Invest Dermatol*, 97 (5):843-848.
- Kuhn A, Singh S, Smith PD, Ko F, Falcone R, Lyle WG, Maggi SP, Wells KE, Robson MC. 2000. Periprosthetic breast capsules contain the fibrogenic cytokines TGF-beta1 and TGF-beta2, suggesting possible new treatment approaches. *Ann Plast Surg*, 44 (4):387-391.
- Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rucker M, Junker D, Haufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD. 2006. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng*, 12 (8):2093-2104.
- Li TG, Shorr N, Goldberg RA. 2005. Comparison of the efficacy of hard palate grafts with acellular human dermis grafts in lower eyelid surgery. *Plast Reconstr Surg*, 116 (3):873-878; discussion 879-880.
- Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A. 1995. Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation*, 60 (1):1-9.
- McGee GS, Broadley KN, Buckley A, Aquino A, Woodward SC, Demetriou AA, Davidson JM. 1989. Recombinant transforming growth factor beta accelerates incisional wound healing. *Curr Surg*, 46 (2):103-106.
- Menger MD, Hammersen F, Messmer K. 1992. In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg*, 40 (1):19-25.

- Menger MD, Walter P, Hammersen F, Messmer K. 1990a. Quantitative analysis of neovascularization of different PTFE-implants. *Eur J Cardiothorac Surg*, 4 (4):191-196.
- Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K. 1990b. Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg*, 38 (3):139-145.
- Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA. 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*, 4 (9):953-961.
- Meyer GT, Matthias LJ, Noack L, Vadas MA, Gamble JR. 1997. Lumen formation during angiogenesis in vitro involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death, and capillary tube remodelling by different populations of endothelial cells. *Anat Rec*, 249 (3):327-340.
- Mignatti P, Rifkin DB. 1996. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein*, 49 (1-3):117-137.
- Millington PF, Brown IA. 1970. Scanning electron microscope studies of some internal surfaces in human skin. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 106 (2):209-219.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. 2002. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*, 7 (12):1191-1204.
- Monnet-Corti V, Santini A, Glise JM, Fouque-Deruelle C, Dillier FL, Liebart MF, Borghetti A. 2006. Connective tissue graft for gingival recession treatment: assessment of the maximum graft dimensions at the palatal vault as a donor site. *J Periodontol*, 77 (5):899-902.
- Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. 1987. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science*, 237 (4820):1333-1336.
- Nakamura Y, Tajima F, Ishiga K, Yamazaki H, Oshimura M, Shiota G, Murawaki Y. 2004. Soluble c-kit receptor mobilizes hematopoietic stem cells to peripheral blood in mice. *Exp Hematol*, 32 (4):390-396.
- Neben S, Marcus K, Mauch P. 1993. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cell subpopulations from the marrow to the blood of mice following cyclophosphamide and/or granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 81 (7):1960-1967.
- Nicosia RF, Villaschi S. 1999. Autoregulation of angiogenesis by cells of the vessel wall. *Int Rev Cytol*, 185:1-43.
- Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. 2007. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis*, 38 (3):258-268.
- Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM. 2004. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest*, 113 (4):516-527.

- Pachence JM. 1996. Collagen-based devices for soft tissue repair. *J Biomed Mater Res*, 33 (1):35-40.
- Panettiè P, Marchetti L, Accorsi D. 2007. Soft cohesive silicone gel breast prostheses: a comparative prospective study of aesthetic results versus lower cohesivity silicone gel prostheses. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 60 (5):482-489.
- Paolantonio M, Dolci M, Esposito P, D'Archivio D, Lisanti L, Di Luccio A, Perinetti G. 2002. Subpedicle acellular dermal matrix graft and autogenous connective tissue graft in the treatment of gingival recessions: a comparative 1-year clinical study. *J Periodontol*, 73 (11):1299-1307.
- Park JE, Keller GA, Ferrara N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, 4 (12):1317-1326.
- Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*, 269 (41):25646-25654.
- Park S, Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Baharestani S, Kleinman ME, Pelo CR, Levine JP, Gurtner GC. 2004. Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plast Reconstr Surg*, 113 (1):284-293.
- Patrick CW, Jr., Zheng B, Johnston C, Reece GP. 2002. Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds. *Tissue Eng*, 8 (2):283-293.
- Peters K, Troyer D, Kummer S, Kirkpatrick CJ, Rauterberg J. 2002. Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro. *Microvasc Res*, 64 (2):334-338.
- Piali L, Hammel P, Uherek C, Bachmann F, Gisler RH, Dunon D, Imhof BA. 1995. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol*, 130 (2):451-460.
- Pins GD, Toner M, Morgan JR. 2000. Microfabrication of an analog of the basal lamina: biocompatible membranes with complex topographies. *Faseb J*, 14 (3):593-602.
- Popa ER, van der Strate BW, Brouwer LA, Tadema H, Schipper M, Fernandes B, Hendriks M, van Luyn MJ, Harmsen MC. 2007. Dependence of neovascularization mechanisms on the molecular microenvironment. *Tissue Eng*, 13 (12):2913-2921.
- Rafii S, Avezilla S, Shmelkov S, Shido K, Tejada R, Moore MA, Heissig B, Hattori K. 2003. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci*, 996:49-60.
- Rahimi RA, Leof EB. 2007. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem*, 102 (3):593-608.
- Reichman-Fried M, Minina S, Raz E. 2004. Autonomous modes of behavior in primordial germ cell migration. *Dev Cell*, 6 (4):589-596.

- Rinsch C, Quinodoz P, Pittet B, Alizadeh N, Baetens D, Montandon D, Aebischer P, Pepper MS. 2001. Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia. *Gene Ther*, 8 (7):523-533.
- Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386 (6626):671-674.
- Robitschek J, Wang D, Hall D. 2008. Treatment of linear scleroderma "en coup de sabre" with AlloDerm tissue matrix. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 138 (4):540-541.
- Rocha FG, Sundback CA, Krebs NJ, Leach JK, Mooney DJ, Ashley SW, Vacanti JP, Whang EE. 2008. The effect of sustained delivery of vascular endothelial growth factor on angiogenesis in tissue-engineered intestine. *Biomaterials*, 29 (19):2884-2890.
- Rodella LF, Rezzani R, Buffoli B, Bonomini F, Tengattini S, Laffranchi L, Paganelli C, Sapelli PL, Bianchi R. 2006. Role of mast cells in wound healing process after glass-fiber composite implant in rats. *J Cell Mol Med*, 10 (4):946-954.
- Rucker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mulhaupt R, Gellrich NC, Menger MD. 2006. Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials*, 27 (29):5027-5038.
- Rucker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Tavassol F, Mulhaupt R, Gellrich NC, Menger MD. 2007. Vascularization and biocompatibility of scaffolds consisting of different calcium phosphate compounds. *J Biomed Mater Res A*,
- Sachsman SM, Rice DH. 2007. Use of AlloDerm implant to improve cosmesis after parotidectomy. *Ear Nose Throat J*, 86 (8):512-513.
- Santos A, Goumenos G, Pascual A. 2005. Management of gingival recession by the use of an acellular dermal graft material: a 12-case series. *J Periodontol*, 76 (11):1982-1990.
- Schiro JA, Chan BM, Roswit WT, Kassner PD, Pentland AP, Hemler ME, Eisen AZ, Kupper TS. 1991. Integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell*, 67 (2):403-410.
- Schultze-Mosgau S, Lee BK, Ries J, Amann K, Wiltfang J. 2004a. In vitro cultured autologous pre-confluent oral keratinocytes for experimental prefabrication of oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33 (5):476-485.
- Schultze-Mosgau S, Rodel F, Radespiel-Troger M, Worl J, Grabenbauer GG, Neukam FW. 2002a. Vascularization of the area between free grafts and irradiated graft beds in the neck in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 40 (1):37-44.
- Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rodel F, Amann K, Radespiel-Troger M, Grabenbauer GG. 2003a. Transforming growth factor-beta receptor-II up-regulation during wound healing in previously irradiated graft beds in vivo. *Wound Repair Regen*, 11 (4):297-305.

- Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Amann K, Radespiel-Troger M, Rodel F, Grabenbauer GG. 2003b. In Vivo TGF-beta 3 expression during wound healing in irradiated tissue. An experimental study. *Strahlenther Onkol*, 179 (6):410-416.
- Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rodel F, Amann K, Radespiel-Troger M, Grabenbauer GG. 2003c. Improved free vascular graft survival in an irradiated surgical site following topical application of rVEGF. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 57 (3):803-812.
- Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Grabenbauer G, Amann K, Radespiel-Troger M, Neukam FW, Rodel F. 2002b. Transforming growth factor beta1 and beta2 (TGFbeta2 / TGFbeta2) profile changes in previously irradiated free flap beds. *Head Neck*, 24 (1):33-41.
- Schultze-Mosgau S, Grabenbauer GG, Radespiel-Troger M, Wiltfang J, Ries J, Neukam FW, Rodel F. 2002c. Vascularization in the transition area between free grafted soft tissues and pre-irradiated graft bed tissues following preoperative radiotherapy in the head and neck region. *Head Neck*, 24 (1):42-51.
- Schultze-Mosgau S, Blaese MA, Grabenbauer G, Wehrhan F, Kopp J, Amann K, Rodemann HP, Rodel F. 2004b. Smad-3 and Smad-7 expression following anti-transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1)-treatment in irradiated rat tissue. *Radiother Oncol*, 70 (3):249-259.
- Schultze-Mosgau S, Kopp J, Thorwarth M, Rodel F, Melnychenko I, Grabenbauer GG, Amann K, Wehrhan F. 2006. Plasminogen activator inhibitor-I-related regulation of procollagen I (alpha1 and alpha2) by antitransforming growth factor-beta1 treatment during radiation-impaired wound healing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 64 (1):280-288.
- Schumacher B, Stegmann T, Pecher P. 1998. The stimulation of neoangiogenesis in the ischemic human heart by the growth factor FGF: first clinical results. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 39 (6):783-789.
- Sepulveda P, Martinez-Leon J, Garcia-Verdugo JM. 2007. Neoangiogenesis with endothelial precursors for the treatment of ischemia. *Transplant Proc*, 39 (7):2089-2094.
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. 1995. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*, 108 (Pt 3):985-1002.
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. 1998. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92 (2):362-367.
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. 2001. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103 (23):2776-2779.
- Slevin M, Krupinski J, Kumar S, Gaffney J. 1998. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Lab Invest*, 78 (8):987-1003.

- Spano A, Palmieri B, Palmizi Taidelli T, Nava MB. 2008. Reduction of Capsular Thickness around Silicone Breast Implants by Zafirlukast in Rats. *Eur Surg Res*, 41 (1):8-14.
- Srivastava A, Jennings LJ, Hanumadass M, Sethi S, DeSagun E, Pavlis N, Reyes HM, Walter RJ. 1999. Xenogeneic acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats. *J Burn Care Rehabil*, 20 (5):382-390.
- Steele MH, Seagle MB. 2006. Palatal fistula repair using acellular dermal matrix: the University of Florida experience. *Ann Plast Surg*, 56 (1):50-53; discussion 53.
- Stephens P, Davies KJ, Occleston N, Pleass RD, Kon C, Daniels J, Khaw PT, Thomas DW. 2001. Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity. *Br J Dermatol*, 144 (2):229-237.
- Supp DM, Boyce ST. 2002. Overexpression of vascular endothelial growth factor accelerates early vascularization and improves healing of genetically modified cultured skin substitutes. *J Burn Care Rehabil*, 23 (1):10-20.
- Tabata Y, Hijikata S, Muniruzzaman M, Ikada Y. 1999. Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed*, 10 (1):79-94.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. 1999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 5 (4):434-438.
- Takami Y, Matsuda T, Yoshitake M, Hanumadass M, Walter RJ. 1996. Dispase/detergent treated dermal matrix as a dermal substitute. *Burns*, 22 (3):182-190.
- Tang K, Breen EC, Gerber HP, Ferrara NM, Wagner PD. 2004. Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. *Physiol Genomics*, 18 (1):63-69.
- ten Dijke P, Arthur HM. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (11):857-869.
- Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gurtner GC. 2005. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*, 105 (3):1068-1077.
- Terino EO. 2001. Alloderm acellular dermal graft: applications in aesthetic soft-tissue augmentation. *Clin Plast Surg*, 28 (1):83-99.
- Truong AT, Kowal-Vern A, Latenser BA, Wiley DE, Walter RJ. 2005. Comparison of dermal substitutes in wound healing utilizing a nude mouse model. *J Burns Wounds*, 4:e4.
- van Beurden HE, Von den Hoff JW, Torensma R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. 2005. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. *J Dent Res*, 84 (10):871-880.

- Velazquez OC. 2007. Angiogenesis and vasculogenesis: inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing. *J Vasc Surg*, 45 Suppl A:A39-47.
- Walter RJ, Matsuda T, Reyes HM, Walter JM, Hanumadass M. 1998. Characterization of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. *Burns*, 24 (2):104-113.
- Wayner EA, Carter WG. 1987. Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alpha and common beta subunits. *J Cell Biol*, 105 (4):1873-1884.
- Wei PC, Laurell L, Geivelis M, Lingen MW, Maddalozzo D. 2000. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. *J Periodontol*, 71 (8):1297-1305.
- Weibel ER. 1989. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. *J Microsc*, 155 (Pt 3):393-403.
- Wilshaw SP, Burke D, Fisher J, Ingham E. 2008. Investigation of the antiadhesive properties of human mesothelial cells cultured in vitro on implantable surgical materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*,
- Wood DN, Allen SE, Andrich DE, Greenwell TJ, Mundy AR. 2004. The morbidity of buccal mucosal graft harvest for urethroplasty and the effect of nonclosure of the graft harvest site on postoperative pain. *J Urol*, 172 (2):580-583.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407 (6801):242-248.
- Yi C, Xia W, Zheng Y, Zhang L, Shu M, Liang J, Han Y, Guo S. 2006. Transplantation of endothelial progenitor cells transferred by vascular endothelial growth factor gene for vascular regeneration of ischemic flaps. *J Surg Res*, 135 (1):100-106.
- Zahavi A, Sklair ML, Ad-EI DD. 2006. Capsular contracture of the breast: working towards a better classification using clinical and radiologic assessment. *Ann Plast Surg*, 57 (3):248-251.
- Zaragosi LE, Billon N, Ailhaud G, Dani C. 2007. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells*, 25 (3):790-797.
- Zeile G, Baake M, Henrici G. 1983. *Kompndium der praktischen Hämatologie*. Darmstadt: GIT Verlag Ernst Giebler,
- Zervolea I, Kletsas D, Stathakos D. 2000. Autocrine regulation of proliferation and extracellular matrix homeostasis in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 276 (2):785-790.
- Zhang F, Waller W, Lineaweaver WC. 2004. Growth factors and flap survival. *Microsurgery*, 24 (3):162-167.

Zhang F, Lei MP, Oswald TM, Pang Y, Blain B, Cai ZW, Lineaweaver WC. 2003. The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds. *Br J Plast Surg*, 56 (4):334-341.

Zhang H, Zhu SJ, Wang W, Wei YJ, Hu SS. 2008. Transplantation of microencapsulated genetically modified xenogeneic cells augments angiogenesis and improves heart function. *Gene Ther*, 15 (1):40-48.

9 ANHANG

9.1 Originalarbeiten, Wissenschaftliche Vortraege und Poster, Preise

Die Inhalte vorliegender Dissertationsschrift wurden im Rahmen folgender Originalarbeiten veroeffentlicht:

1. **Mueller CK**, Lee SY, Schultze-Mosgau S. Characterization of interfacial reactions between connective tissue and allogeneous implants used for subdermal soft tissue augmentation. Int J Oral Maxillofac Surg **2009**, 38 (11): 1194-1200.
2. **Mueller CK**, Thorwarth M, Schultze-Mosgau S. Angiogenic Gene-Modified Fibroblasts for Induction of Localized Angiogenesis. J Surg Res **2010**, 160 (2): 340-348.
3. **Mueller CK**, Thorwarth M, Schultze-Mosgau S. Transgenic overexpression of VEGF164 enhances topical neoangiogenesis without detectable local or systemic side effects. Ann Plast Surg **2010**, 65(1): 85-90.
4. **Mueller CK**, Schultze-Mosgau S. Histomorphometric analysis of the phenotypical differentiation of recruited macrophages following subcutaneous implantation of an allogeneous acellular dermal matrix. Int J Oral Maxillofac Surg **2011**, 40: 401-407.

Folgende wissenschaftliche Vortraege wurden im Rahmen des Dissertationsprojektes gehalten:

1. **Müller CK**, Schultze-Mosgau S. Neovaskularisation natürlicher Polymere nach Implantation – Untersuchung des Einflusses zellulärer Besiedelung. FZL-Seminar, Jena, **21. April 2008**.
2. **Mueller CK**, Schultze-Mosgau S. Zelltherapie zur Modulation der Einheilung dreidimensionaler Mundschleimhautäquivalente. 58. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (DGMKG), Münster, **15.-17. Mai 2008**.

3. **Müller CK**, Lee SY, Schultze-Mosgau S. Exogene, Fibroblasten-basierte Applikation von VEGF-Plasmid zur Stimulation der Neovaskularisation im Rahmen der Wundheilung. 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische & Wiederherstellungschirurgie (DGPW), Rostock, **10.-11. September 2009**.
4. **Müller CK**, Schultze-Mosgau S. Charakterisierung der Gewebereaktion auf allogene, extrazellulärmatrix-basierte Scaffolds zur periimplantären Weichgewebeaugmentation. 24. DGI Jahreskongress, Hamburg, **25.-27. November 2010**.
5. **Mueller CK**, Mtsariashvili M, Schultze-Mosgau S. Charakterisierung der Biointegration allogener Kollagenmembranen für die mukogingivale Chirurgie. Deutscher Zahnärztetag, Frankfurt am Main, **11.-12. November 2011**.
6. **Müller CK**, Mtsariashvili M, Müller J, Eggers C, Mansel R, Schultze-Mosgau S. Etablierung eines controlled release Systems zur topischen Applikation ossoinduktiver Wachstumsfaktoren am Beispiel von VEGF. 25. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Implantologie (DGI) e.V., Dresden, **24. – 26. November 2011**.

Folgende wissenschaftliche Poster wurden im Rahmen des Dissertationsprojektes praesentiert:

1. **Mueller CK**, Schultze-Mosgau S. Modulation der Gewebeintegration von Tissue-Engineering-Produkten zur Behandlung gingivaler Rezessionen. 22. BZÄK/ DGZMK/ DENTSPLY-Förderpreis im Rahmen des Deutschen Zahnärztetages. Stuttgart, **24.-25. Oktober 2008**.
2. **Mueller CK**, Schultze-Mosgau S. Zellbasierter VEGF-Gentransfer zur Modulation der Einheilung im Tissue-Engineering hergestellter Bindegewebe. 59. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (DGMKG), Wien, **3.-6. Juni 2009**.
3. **Mueller CK**, Schultze-Mosgau S. Subcutaneous, fibroblast-based delivery of plasmid VEGF164 promotes healing of surgical wounds. 5th Joint Meeting of the European Tissue Repair Society (ETRS) & the Wound Healing Society (WHS), Limoges, France, **August 25th-29th 2009**.
4. **Mueller CK**, Schultze-Mosgau S. Fibroblast-based VEGF-gene-delivery-A “trojan-horse” approach to promote neoangiogenesis in wound healing. 39th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (ESDR), Budapest, Hungary, **September 9th-12th 2009**.
5. **Müller CK**, Schultze-Mosgau S. Zell-basierter Gentransfer zur Reduktion der Narbenbildung durch Induktion der Neoangiogenese und Reduktion der Fibroproliferation. 5. Strategiesitzung der Deutschen Gesellschaft für Dermatochirurgie (DGDC) e.V., Leipzig, **4.-5. Juni 2010**.

Das Projekt wurde mit folgenden wissenschaftlichen Preisen ausgezeichnet:

1. Nicolai Guleke – Preis 2010 der Thüringischen Gesellschaft für Chirurgie e.V. (Dotation: 1000,-€) für die Arbeit: **Mueller CK**, Schultze-Mosgau S. „Radiation-induced microenvironments – The molecular basis for free flap complications in the pre-irradiated field?“
2. Preis für den besten Vortrag im Forum Wissenschaft – Grundlagenforschung anlässlich des 25. Jahreskongresses der Deutschen Gesellschaft für Implantologie (DGI) e.V. vom 24.-26.11.2011 in Dresden für den Vortrag „Etablierung eines controlled release Systems zur topischen Applikation ossoinduktiver Wachstumsfaktoren am Beispiel von VEGF“. (Dotation: 500,-€)

Auf Grundlage des Projektes konnten nachstehende Projektfolgeanträge genehmigt werden:

1. “Bedeutung der phänotypischen Differenzierung rekrutierter Makrophagen für die Qualität der Weichgeweberekonstruktion durch biologische, ECM-basierte Scaffolds“, ProChance 2009, Förderlinie A2, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
2. „Praefabrikation myocutaner Weichgewebetransplantate durch lokalisierte Neoangiogenese-Stimulation mittels zell-basierter VEGF-Gentherapie“, Einzelförderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den _____

Cornelia Katharina Müller

9.2 Danksagungen

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Schultze-Mosgau für die Ermöglichung dieser Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie/ Plastische Chirurgie sowie die Betreuung und Förderung.

Herrn Dr. Clement danke ich für die Ermöglichung der Durchführung von Versuchen in seiner gentechnischen Anlage der Sicherheitsstufe 1.

Außerdem danke ich dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Friedrich-Schiller-Universität für die Aufnahmen der Allo-Tx.

Desweiteren danke ich dem IVTK für die Pflege der Tiere während des Versuchszeitraumes.

Mein ganz besondere Dank gilt Frau Moll und Frau Lee für die tatkräftige Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die durch ihr Verstaendnis und ihre Motivation das Gelingen dieser Arbeit ueberhaupt erst ermoeeglicht haben